

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - FACULDADE DE MEDICINA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria

Dissertação de Mestrado

ASSOCIAÇÃO ENTRE GENES CANDIDATOS E MEDIDAS
NEUROPSICOLÓGICAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM
TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

Christian Kieling

Orientador

Luis Augusto Rohde

Porto Alegre

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - FACULDADE DE MEDICINA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria

ASSOCIAÇÃO ENTRE GENES CANDIDATOS E MEDIDAS
NEUROPSICOLÓGICAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM
TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

Christian Kieling

Orientador

Luis Augusto Rohde

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria
como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre em Psiquiatria.

Porto Alegre

2007

K47a Kieling, Christian

Associação entre genes candidatos e medidas neuropsicológicas em crianças e adolescentes com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade / Christian Kieling ; orient. Luis Augusto Rohde - 2007. 89 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Porto Alegre, BR-RS, 2007.

1. Transtorno da falta de atenção com hiperatividade 2. Fenótipo 3. Criança 4. Adolescente 5. Genótipo 6. Polimorfismo genético I. Rohde, Luis Augusto Paim II. Título.

NLM: WS 350.8.A8

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

*Ask not what disease the person has,
but rather what person the disease has.*

- (atribuído a) William Osler

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luis Augusto Rohde, pelo incentivo, confiança e generosidade na orientação deste trabalho. Incansável na busca pela excelência, aproximou fronteiras, me permitindo enxergar mais longe. Sua paixão e dedicação pela pesquisa são altamente contagiantes.

À Profa. Mara H. Hutz, paradigma de competência, pelo estímulo na reflexão científica.

Aos colegas do Programa de Déficit de Atenção e Hiperatividade do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial ao grupo da genética: Tatiana Roman, Júlia Genro, Ana Paula Guimarães, Cristian Zeni, Guilherme Polanczyk e Marcelo Schmitz.

Às psicólogas Heloísa Kaefer, Natália Soncini e Márcia Knijnik, pela realização dos testes neuropsicológicos empregados nesta dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, pelo acolhida e pelo convívio enriquecedor.

Aos professores da Faculdade de Medicina, pela compreensão e pelo suporte.

Aos colegas da ATM07/2 e de outras turmas, pela amizade e pelo apoio.

Aos meus pais, pelo amor e incentivo sempre renovados.

À Renata, pelo inestimável.

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract	8
1. Introdução	10
2. Base conceitual e revisão da literatura	14
2.1. Neurobiologia do TDAH	14
2.2. Neuropsicologia do TDAH	19
2.3. Endofenótipos em psiquiatria: fundamentos e aplicações	23
3. Objetivos	29
4. Proteção dos direitos humanos	30
5. Artigo 1	36
5.1. Versão em inglês	36
5.2. Versão em português	48
6. Artigo 2	61
7. Conclusão	86

RESUMO

Introdução: As heterogeneidades genotípica e fenotípica do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) impõem barreiras à elucidação de suas bases biológicas. O uso do conceito de endofenótipo apresenta-se como estratégia através da qual uma redução na variabilidade fenomenológica pode proporcionar um aumento na sensibilidade a dimensões específicas do fenótipo, facilitando a identificação de substratos genéticos do transtorno.

Métodos: Em uma amostra clínica de crianças e adolescentes com TDAH, buscou-se a identificação de diferenças no desempenho neuropsicológico de acordo com grupo genotípico. Os testes utilizados foram o *Continuous Performance Test* (CPT) e o *Wisconsin Card Sorting Test* (WCST). Investigaram-se polimorfismos funcionais dos genes para o receptor D4 de dopamina (DRD4) e para a enzima dopamina-beta-hidroxilase (DBH). Análises de associação e familiares foram realizadas, avaliando-se diferentes variáveis como potenciais confundidores.

Resultados: A presença de pelo menos um alelo de 7 repetições do DRD4 esteve associada a um maior número de erros por comissão no CPT ($p=0,036$), enquanto que o homozigose 44 protegeu contra erros tanto por omissão ($p=0,017$) quanto por comissão ($p=0,025$), mesmo após ajuste para idade. Já em relação ao gene DBH, o homozigose CC no polimorfismo -1021 C/T esteve associada a um menor desempenho cognitivo medido por um escore fatorial que explicou 83,8% do desempenho nos testes CPT e WCST ($p=0,002$). Este achado de associação foi corroborado por uma análise familiar confirmatória.

Discussão: A redução da variabilidade fenomenológica por meio do uso de testes neuropsicológicos de função executiva permitiu a identificação de subgrupos de pacientes com TDAH associados a polimorfismos funcionais de genes que codificam proteínas do sistema catecolaminérgico. Além disso, observou-se que o refinamento do fenótipo TDAH por meio de medidas compostas de funções executivas pode ajudar no entendimento das bases moleculares do transtorno. Tais achados fornecem evidência adicional acerca do papel de polimorfismos dos genes DRD4 e DBH no desempenho de crianças e adolescentes com o diagnóstico de TDAH em testes neuropsicológicos de funções executivas.

ABSTRACT

Introduction: The genotypic and phenotypic heterogeneities of attention-deficit and hiperactivity disorder (ADHD) hinder the elucidation of its biological bases. The use of the concept of endophenotype is a strategy through which a reduction in the phenomenological variability may enhance the sensitivity to specific dimensions of the phenotype, therefore contributing to the identification of the genetic underpinnings of the disorder.

Methods: In a clinical sample of children and adolescents with ADHD, differences in neuropsychological performance were investigated according to genotypic group. The following tests were used: the Continuous Performance Test (CPT) and the Wisconsin Card Sorting Test (WCST). Functional polymorphisms of genes coding for the dopamine D4 receptor (DRD4) and the dopamine-beta-hydroxylase enzyme (DBH) were investigated. Association and family-based analyses were performed, assessing different variables as potential confounders.

Results: For DRD4, the presence of at least one 7 repeat allele was associated with a higher number of commission errors in the CPT ($p=0.036$), while the 44 homozygosity protected against both errors of omission ($p=0.017$) and commission ($p=0.025$), even after adjusting for age. Regarding the DBH gene, the CC homozygosity for the -1021 C/T polymorphism was associated with a worse cognitive performance as measured by a factorial score that explained 83.8% of the performance in both CPT and WCST ($p=0.002$). This association was corroborated by a confirmatory family-based analysis.

Discussion: The use of neuropsychological tests of executive function to reduce the phenomenological variability of ADHD allowed the identification of subgroups of

patients associated with functional polymorphisms of genes that code for proteins critical to catecholaminergic systems. In addition, the refinement of the ADHD phenotype by means of composite measures of executive function can contribute to a better understanding of the molecular bases of the disorder. These findings provide further evidence on the role of DRD4 and DBH polymorphisms in the performance of children and adolescents with ADHD in neuropsychological tests of executive function.

1. Introdução

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é uma síndrome ou categoria diagnóstica definida pelo aparecimento precoce da tríade desatenção, hiperatividade e impulsividade. Tais características devem se manifestar em um padrão persistente de desatenção e/ou hiperatividade, mais freqüente e grave do que aquele tipicamente observado em indivíduos em nível equivalente de desenvolvimento (APA, 1994). De acordo com os critérios diagnósticos da quarta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico da Associação Norte-Americana de Psiquiatria (DSM-IV), alguns dos sintomas que causam prejuízo devem estar presentes em dois ou mais contextos e ter início antes dos sete anos de idade. Deve, ainda, haver evidência clara de interferência no funcionamento social, acadêmico ou ocupacional do indivíduo.

O fenótipo do TDAH está associado a um prejuízo funcional abrangente, com início na infância e que com freqüência persiste até a idade adulta. Crianças com TDAH podem apresentar baixo rendimento escolar, histórico de repetências, suspensões ou expulsões e dificuldades de relacionamento com pares (Lahey et al, 2004). Na adolescência, observa-se um maior número de acidentes com lesões físicas (Swensen et al, 2004). Ao longo do tempo, indivíduos com TDAH têm maior chance de desenvolver outros transtornos psiquiátricos, particularmente transtornos de humor, abuso/dependência de substâncias e personalidade anti-social (Biederman et al, 1996; Wilens et al, 2004). Em conjunto, tais características traduzem-se em escores inferiores em medidas de qualidade de vida (Klassen et al, 2004).

O diagnóstico de TDAH é clínico e baseado em critérios operacionais que variam de acordo com a classificação nosológica empregada. Os critérios propostos pelo DSM-IV

exigem a presença de pelo menos seis de nove sintomas de desatenção e/ou de hiperatividade/impulsividade, conforme apresentado na Tabela 1. A partir da distribuição de sintomas entre os diferentes domínios, pode-se definir um dos três subtipos de TDAH: predominantemente desatento (seis ou mais sintomas de desatenção e menos de seis sintomas de hiperatividade/impulsividade); predominantemente hiperativo/impulsivo (seis ou mais sintomas de hiperatividade/impulsividade e menos de seis sintomas de desatenção); ou combinado (seis ou mais sintomas em ambas as dimensões).

Contudo, a variabilidade na apresentação clínica do TDAH supera em muito a divisão tripartite do transtorno, cuja heterogeneidade está relacionada a fatores como idade de início, gênero, perfil de comorbidades, intensidade de sintomas e resposta ao tratamento. Além disso, embora a abordagem proposta pelo DSM-IV seja de natureza categórica, o próprio estabelecimento de um ponto de corte (número mínimo de sintomas) para a caracterização do diagnóstico evidencia o caráter dimensional do TDAH.

Contrastando com as diretrizes do DSM-IV, a definição de transtorno hipercinético (TH) da décima revisão da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10) requer a presença de sintomas nas três dimensões (i.e., desatenção, hiperatividade e impulsividade). Uma outra diferença importante entre os dois sistemas classificatórios é a possibilidade de diagnóstico simultâneo de comorbidades. Enquanto o DSM-IV exige apenas que os sintomas de TDAH não sejam mais bem explicados por outro transtorno mental, a CID-10 não permite o diagnóstico de TH na vigência de transtornos de ansiedade, bem como durante episódios maníacos ou depressivos (WHO, 1996).

Tabela 1. Critérios diagnósticos para transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

A. Ou (1) ou (2)

(1) seis (ou mais) dos seguintes sintomas de desatenção persistiram por pelo menos 6 meses, em grau mal-adaptativo e inconsistente com o nível de desenvolvimento:

(a) freqüentemente deixa de prestar atenção a detalhes ou comete erros por descuido em atividades escolares, de trabalho ou outras

(b) com freqüência tem dificuldades para manter a atenção em tarefas ou atividades lúdicas

(c) com freqüência parece não escutar quando lhe dirigem a palavra

(d) com freqüência não segue instruções e não termina seus deveres escolares, tarefas domésticas ou deveres profissionais (não devido a comportamento de oposição ou incapacidade de compreender instruções)

(e) com freqüência tem dificuldade para organizar tarefas e atividades

(f) com freqüência evita, antipatiza ou reluta a envolver-se em tarefas que exijam esforço mental constante (como tarefas escolares ou deveres de casa)

(g) com freqüência perde coisas necessárias para tarefas ou atividades (por ex., brinquedos, tarefas escolares, lápis, livros ou outros materiais)

(h) é facilmente distraído por estímulos alheios à tarefa

(i) com freqüência apresenta esquecimento em atividades diárias

(2) seis (ou mais) dos seguintes sintomas de hiperatividade persistiram por pelo menos 6 meses, em grau mal-adaptativo e inconsistente com o nível de desenvolvimento:

(a) freqüentemente agita as mãos ou os pés ou se remexe na cadeira

(b) freqüentemente abandona sua cadeira em sala de aula ou outras situações nas quais se espera que permaneça sentado

(c) freqüentemente corre ou escala em demasia, em situações nas quais isto é inapropriado (em adolescentes e adultos, pode estar limitado a sensações subjetivas de inquietação)

(d) com freqüência tem dificuldade para brincar ou se envolver silenciosamente em atividades de lazer

(e) está freqüentemente “a mil” ou muitas vezes age como se estivesse “a todo vapor”

(f) freqüentemente fala em demasia

(g) freqüentemente dá respostas precipitadas antes de as perguntas terem sido completadas

(h) com freqüência tem dificuldade para aguardar sua vez

(i) freqüentemente interrompe ou se mete em assuntos de outros (por ex., intromete-se em conversas ou brincadeiras)

B. Alguns sintomas de hiperatividade-impulsividade ou desatenção que causaram prejuízo estavam presentes antes dos 7 anos de idade.

C. Algum prejuízo causado pelos sintomas está presente em dois ou mais contextos (por ex., na escola [ou trabalho] e em casa).

D. Deve haver claras evidências de prejuízo clinicamente significativo no funcionamento social, acadêmico ou ocupacional.

E. Os sintomas não ocorrem exclusivamente durante o curso de um transtorno invasivo do desenvolvimento, esquizofrenia ou outro transtorno psicótico e não são melhor explicados por outro transtorno mental (por ex., transtorno do humor, transtorno de ansiedade, transtorno dissociativo ou um transtorno de personalidade).

A prevalência do TDAH é estimada em torno de 5% na população de crianças e adolescentes em diferentes regiões geográficas. De acordo com um recente estudo de meta-regressão (Polanczyk et al, 2007), a discrepância entre os valores de prevalência em diferentes estudos é explicada em grande medida pela utilização de diferentes instrumentos diagnósticos. Estudos que investigaram o construto TDAH em diferentes países evidenciaram a validade do diagnóstico em contextos distintos (Rohde, 2002). Tais achados, em conjunto com um crescente corpo de outras evidências científicas, sugerem fortemente a presença de componentes neurobiológicos na fisiopatologia do TDAH.

A elucidação das bases biológicas do transtorno pode se beneficiar de ferramentas auxiliares à entrevista clínica que permitam uma redução na variabilidade fenotípica observada entre indivíduos com TDAH. Nesse sentido, dificuldades evidenciadas em testes neuropsicológicos, que também interferem na adaptação do sujeito às demandas sociais, sobretudo as escolares, são particularmente úteis na caracterização de fenótipos mais homogêneos.

2. Base conceitual e revisão da literatura

2.1. Neurobiologia do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

Alterações em diferentes sistemas neurotransmissores têm sido implicadas nos processos fisiopatológicos subjacentes ao TDAH. As vias do sistema catecolaminérgico - relacionadas à farmacodinâmica dos principais medicamentos utilizados no tratamento do TDAH - vêm sendo o principal alvo de investigação. Evidências provenientes de pesquisas em neuroimagem, bioquímica e genética têm associado sistematicamente estruturas e funções relacionadas aos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico com o TDAH.

Estudos realizados nas últimas duas décadas demonstraram consistentemente que indivíduos com TDAH possuem um volume cerebral menor do que controles pareados (Casey et al, 2007). Um estudo longitudinal conduzido por Castellanos et al (2002) revelou que alterações precoces em crianças diagnosticadas com TDAH, quando comparadas a um grupo controle, mantêm-se constantes ao longo do desenvolvimento (com exceção do núcleo caudado, para o qual a diferença entre casos e controles torna-se mínima na adolescência). Uma metanálise recentemente publicada identificou diferenças volumétricas significativas entre indivíduos com TDAH e controles nas seguintes regiões encefálicas: vermis cerebelar, sobretudo lóbulos ínfero-posteriores; esplênio do corpo caloso; núcleo caudado (somente à direita); e volume cerebral total (Valera et al, 2007). Em suma, estudos funcionais e estruturais convergem para o envolvimento de regiões de intensa atividade catecolaminérgica, enfatizando sobretudo o córtex pré-frontal e suas conexões com o córtex parietal, os núcleos da base e o cerebelo.

Catecolaminas, especificamente dopamina (DA) e noradrenalina (NA), são essenciais para a ativação de regiões cerebrais como o córtex pré-frontal, e um número crescente de estudos implica o sistema catecolaminérgico na fisiopatologia do TDAH (Fischman & Madras, 2005). O mecanismo exato através do qual esses sistemas neurotransmissores agem ainda é pouco compreendido. Presume-se, contudo, que na maioria das situações não há uma correlação direta entre níveis catecolaminérgicos e atividade cerebral. Uma das hipóteses mais aceitas propõe a existência de uma relação em curva u invertida entre níveis extracelulares de DA ou NA e desempenho cognitivo (Arnsten, *in press*). Nesse sentido, estudos de tomografia por emissão de pósitrons (PET) já evidenciaram o efeito regulador de diferentes polimorfismos do gene para a enzima catecol-O-metil-transferase (COMT, responsável pela degradação de DA) na ativação cerebral durante a execução de tarefas de memória de trabalho (Meyer-Lindenberg et al, 2005). Acredita-se, assim, que haveria níveis ótimos para o funcionamento neuronal, o qual estaria prejudicado tanto na falta quanto no excesso de neurotransmissores.

Juntamente com os dados de pesquisas neurobiológicas, a observação de uma alta recorrência do TDAH em famílias (Biederman et al, 1991) tornou o transtorno um alvo atrativo para a investigação genética. A pesquisa por genes de susceptibilidade ao TDAH, isto é, genes não diretamente causais, mas que conferem uma predisposição genética ao indivíduo, tem focado principalmente o papel de genes codificadores de proteínas essenciais para a neurotransmissão catecolaminérgica.

O TDAH, como os demais transtornos psiquiátricos, é considerado uma entidade multifatorial, ou seja, trata-se de um fenótipo resultante de uma interação complexa entre múltiplos genes - com diferentes tamanhos de efeitos - e fatores ambientais. Estima-se que um grande número de genes esteja envolvido na etiologia do TDAH,

cada um deles exercendo um efeito diferente e sujeito a interações com outros genes e fatores ambientais, incluindo aí fatores intra-uterinos, hábitos de vida, ambiente familiar, acadêmico e social. Devido à sua complexidade, a investigação de doenças multifatoriais tipicamente envolve um conjunto de diferentes desenhos metodológicos, que inclui estudos genéticos clássicos (famílias, adoção e gêmeos) e moleculares (estudos de associação e ligação). Enquanto os primeiros fornecem evidências da existência de componentes genéticos, os últimos visam a identificar quais são esses fatores.

Estudos de associação buscam comparar as frequências alélicas entre grupos de casos e controles, sendo positivos quando encontram uma prevalência genotípica significativamente diferente entre os grupos. São particularmente úteis para a investigação de doenças complexas, que lidam com vários genes candidatos de pequeno efeito. Seu grande desafio é o pareamento entre casos e controles, já que idealmente buscam-se indivíduos que não apresentem diferenças em outras variáveis que não o seu status de caso ou controle (outras variáveis estas que, caso presentes, constituiriam as chamadas variáveis confundidoras).

Análises de ligação em heranças complexas incluem, via de regra, grupos familiares, valendo-se do princípio mendeliano de que determinado alelo tem, de modo aleatório, 50% de risco de ser transmitido dos genitores para sua prole. Um de seus exemplos é o modelo do teste de desequilíbrio de transmissão (TDT), no qual busca-se uma transmissão preferencial de determinado alelo (estatisticamente acima dos 50% previstos) para os filhos que apresentem determinado traço fenotípico. Estudos familiares são, desse modo, especialmente robustos a um tipo específico de variável de confusão, sobretudo quando comparados a estudos de associação: a estratificação populacional, que ocorre quando há uma sobre-representação de determinado grupo

étnico na comparação entre casos e controles, fenômeno que enviesaria a distribuição genotípica entre grupos independentemente da relação entre fator em estudo e desfecho.

Resultados de estudos de genética tradicional e molecular convergem para sugerir que tanto fatores genéticos quanto fatores não genéticos contribuem para a gênese do TDAH (Faraone et al, 2005). É importante lembrar que evidências de agregação familiar não necessariamente implicam fatores genéticos na etiologia do transtorno, uma vez que o convívio em um mesmo ambiente (família) também contribui para a recorrência familiar de um transtorno. Torna-se assim necessário isolar do familiar a parcela atribuível a fatores genéticos.

Utilizando diferentes desenhos metodológicos, observou-se altas estimativas de herdabilidade para o TDAH, com valores atingindo 70% a 80% (Faraone & Doyle, 2001). Sendo herdabilidade a parcela da variância da manifestação fenotípica explicada pela variação genotípica, sugere-se que genes possuam um papel fundamental na susceptibilidade ao transtorno. Críticas ao conceito de herdabilidade incluem a ausência de espaço para uma variância conjunta (interação) entre genes e ambientes, hoje reconhecida como fundamental na gênese de comportamentos humanos. Além disso, ao partilhar a variância fenotípica total em contribuições genéticas e ambientais, o componente genético, mesmo que constante, pode aparentemente variar em função do impacto da variância ambiental na variância fenotípica (quanto mais homogêneo o ambiente, maior a contribuição genética). O fato é que a existência de uma herdabilidade considerável, sobretudo quando replicada em diferentes populações e utilizando diferentes métodos, sugere fortemente um papel para elementos genéticos na etiologia do TDAH.

Entre os genes estudados nas diferentes modalidades de estudos realizadas até o momento, destacam-se o gene para os receptores tipo quatro e cinco de dopamina (DRD4, DRD5); o gene para o transportador de dopamina (DAT1); o gene para a enzima dopamina-beta-hidroxilase (DBH); bem como o gene SNAP-25 (que codifica uma proteína sináptica responsável pela liberação de neurotransmissores via exocitose) e os genes serotoninérgicos 5HTT (que codifica o transportador de serotonina) e HTR1B (responsável pela codificação do receptor de serotonina).

Um ponto importante para a plausibilidade de estudos de associação entre polimorfismos genéticos e doenças ou transtornos é a definição (seja *in vivo*, *in vitro* ou *in silico*) do papel que a alteração genética representa no organismo. Torna-se, desse modo, fundamental a investigação acerca da funcionalidade do polimorfismo, entendida como sendo a repercussão biológica do mesmo nos processos de expressão gênica, de codificação de proteínas ou de ações bioquímicas de tais produtos gênicos. Para alguns dos genes candidatos para o TDAH, já existem investigações avançadas em relação a sua funcionalidade.

O polimorfismo -1021C/T do gene DBH demonstrou ser um regulador extremamente importante da atividade enzimática da enzima dopamina-β-hidroxilase, respondendo por até 50% de seus níveis plasmáticos e de sua atividade enzimática (Cubells & Zabetian, 2004). Tal enzima é fundamental para a conversão de DA em NA nos terminais sinápticos. Já no caso do gene DRD4, um polimorfismo em número variável de repetições em tandem (VNTR) no éxon III do também demonstrou *in vitro* respostas diferenciadas ao estímulo catecolaminérgico (tanto DA quanto NA são potentes agonistas do receptor DRD4).

Em uma revisão sistemática da literatura, Faraone et al (2005) resumiram os principais achados de estudos de associação e de ligação em TDAH (Tabela 2). Os reduzidos *odds ratios* globais encontrados sugerem que a contribuição de polimorfismos genéticos para a etiologia do TDAH ocorre através de muitos genes de pequeno efeito cada um. Os autores da revisão sugerem que a aplicação de estratégias que aumentem o poder estatístico de estudos torna-se imperiosa na tentativa de melhor caracterizar a relação entre genes e comportamentos. Tais estratégias incluem a condução de metanálises e estudos colaborativos com grupos de diferentes países e origens étnicas, a inclusão de fatores ambientais (sobretudo dados perinatais) como covariáveis, bem como o refinamento do fenótipo complexo através de técnicas neurocientíficas específicas.

Tabela 2. *Odds ratios* significativos para variantes genéticas avaliadas em três ou mais estudos familiares ou de casos e controles (extraído de Faraone et al, 2005)

Polimorfismo	Desenho	OR	95% IC
Receptor D4 de dopamina (VNTR éxon III)	familiar	1,16	1,03-1,31
Receptor D4 de dopamina (VNTR éxon III)	casos-controles	1,45	1,27-1,65
Receptor D5 de dopamina (repetição CA)	familiar	1,24	1,12-1,38
Transportador de dopamina (VNTR)	familiar	1,13	1,03-1,24
Dopamina-β-hidroxilase (Taq)	casos-controles	1,33	1,11-1,59
SNAP-25 (T1065G)	familiar	1,19	1,03-1,38
Transportador de serotonina (5-HTTLPR)	casos-controles	1,31	1,09-1,59
Receptor de serotonina (HTR1B)	familiar	1,44	1,14-1,83

OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança; VNTR, número variável de repetições em tandem.

2.2. Neuropsicologia do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

O modelo causal de desenvolvimento do TDAH é baseado em diversos pressupostos, dentre os quais as teorias neuropsicológicas ocupam um lugar de destaque. Há mais

de um século, a utilização de princípios e técnicas neuropsicológicas tem se revelado extremamente frutífera na pesquisa acerca da natureza de doenças neurológicas e psiquiátricas (Lezak, 1995). Em relação ao TDAH, as últimas décadas observaram o surgimento de distintas teorias que auxiliaram no entendimento dos processos cognitivos subjacentes ao transtorno.

Especialmente relevante foi a aplicação do conceito de funções executivas (FE), geralmente concebidas como a capacidade mental de controlar e propositadamente aplicar as próprias habilidades mentais. Apesar da existência de divergências na literatura acerca da definição precisa de FE, há um razoável consenso de que FE incluem processos como manter sustentadamente ou redirecionar a atenção, inibir respostas inapropriadas, planejar estratégias para comportamento futuro, iniciar e executar tais estratégias, além da capacidade de intercambiar flexivelmente estratégias de resolução de problemas. Partindo desse modelo, os sintomas do TDAH podem ser considerados como sendo causados pela disfunção em sistemas de controle neurocognitivo, estando as relações entre cérebro e comportamento amplamente mediadas por déficits em processos inibitórios (Sonuga-Barke, 2005). De acordo com Barkley (1997), o padrão geral de disfunção executiva associado ao TDAH baseia-se no aparecimento precoce de déficits na inibição de respostas, que seria a capacidade de inibir respostas inapropriadas em favor de alternativas mais apropriadas, sendo considerada um pré-requisito para o auto-controle, a regulação emocional e a flexibilidade cognitiva.

De maneira simplificada, FE representam processos *top-down* que facilitam a tomada de decisões através da manutenção de informações acerca de decisões possíveis na memória de trabalho e da integração desse conhecimento com informações provenientes do contexto, com objetivo de identificar a melhor ação para a situação

em particular (Willcutt et al, 2005). Uma gama de dados observacionais indica que lesões a estruturas do córtex pré-frontal acarretam déficits em tarefas de FE. Além disso, diversos trabalhos têm demonstrado o envolvimento de estruturas neurais relevantes para FE no TDAH (Nigg et al, 2005). É interessante ressaltar que os prejuízos observados no grupo com TDAH em relação a funções executivas parecem ser independentes do perfil de comorbidades (Nigg et al, 1998) - o efeito contrário, que pode ser o caso na presença de sintomas atencionais subsindrômicos (por exemplo, cinco sintomas de TDAH) em pacientes com outros transtornos, nunca foi testado.

Trabalhos recentes têm desafiado o pressuposto de homogeneidade neuropsicológica do TDAH. Estudos sugerem que outros processos, como aversão à demora, também contribuem de maneira expressiva para a composição do quadro clínico. Na aversão à demora há uma reação emocional negativa à imposição de demora, bem como uma redução no controle exercido por recompensas futuras sobre o comportamento presente (Sagvolden et al, 1998). Dados experimentais sugerem que a inibição de respostas e a aversão à demora constituem processos independentes (Solanto et al, 2001), correspondendo aquela mais a processos cognitivos propriamente ditos e estando esta mais relacionada a processos motivacionais nos quais há atribuição de valor. Cabe ressaltar que mais do que elementos de teorias competidoras, inibição de respostas e aversão à demora muito provavelmente constituem processos complementares na fisiopatologia do TDAH (Sonuga-Barke, 2005).

Até recentemente, a pesquisa em neuropsicologia do TDAH focou-se na busca de um déficit único central que oferecesse uma explicação causal abrangente dos sintomas comportamentais encontrados no transtorno (Pennington, 2005). Os resultados obtidos na maioria dos estudos, contudo, têm sugerido que um modelo de déficit

único não será suficiente para a compreensão dos processos neuropsicológicos subjacentes aos transtornos psiquiátricos. Revisões metanalíticas têm deixado claro que nenhum teste ou bateria de testes neuropsicológicos possui acurácia suficiente para o diagnóstico de TDAH (Frazier et al, 2004). Dada a inexistência de padrões-ouro biológicos em psiquiatria (todo teste é comparado ao diagnóstico clínico baseado em critérios operacionais), cabe o questionamento acerca de qual o melhor papel para os estudos em neuropsicologia no entendimento do TDAH.

Toda teoria baseada em déficit único esbarra na limitação de não atingir sensibilidade e especificidade suficientes para abarcar a categoria diagnóstica TDAH (fenômeno semelhante ocorre mesmo na partição do fenótipo em subtipos predominantemente desatento e hiperativo/impulsivo). Entretanto, dada a existência de critérios diagnósticos padronizados (sejam do DSM-IV ou da CID-10), medidas neuropsicológicas de fato não são necessárias para o processo diagnóstico. Como levantado por Nigg (2005), a questão nosológica que realmente passa a se colocar é a seguinte: quantos indivíduos entre aqueles que preenchem critérios para o transtorno podem ser vistos como possuindo déficits neuropsicológicos de acordo com os modelos teorizados?

Qualquer que seja o teste e o ponto de corte adotados, sempre haverá uma parcela de indivíduos “negativos” com o transtorno e outra de “positivos” sem o transtorno. Ao adotar limiares mais restritivos, aumenta-se o valor preditivo positivo às custas da redução do valor preditivo negativo de determinado teste. No caso do TDAH, as propriedades distributivas do desempenho neuropsicológico de crianças e adolescentes podem ser extremamente relevantes para o entendimento desta questão (Nigg, 2005). Grupos de crianças com TDAH invariavelmente apresentam uma

maior variância do que grupos controles, sugerindo que os efeitos de grupo apresentados na literatura são na realidade carregados por um subgrupo de indivíduos.

Uma meta-análise publicada em 2005 por Willcutt et al reuniu 83 estudos, totalizando 3734 casos e 2969 controles, e avaliou o desempenho de crianças e adolescentes em testes de função executiva. Os resultados sumarizados, apesar de evidenciarem uma diferença significativa entre grupos nas diferentes tarefas, apontaram pequenos a moderados tamanhos de efeito padronizados para a comparação entre grupos com e sem TDAH. Além disso, ficou clara a sobreposição de distribuições de resultados, levando à conclusão de que os déficits medidos pelos testes avaliados não contribuem causalmente para o diagnóstico de TDAH em todos os casos. Os autores concluem então que déficits em funções executivas não são nem necessários nem suficientes para causar todos os casos de TDAH.

Reconhecendo a natureza multifatorial da etiologia cognitiva do transtorno, Nigg (2005) propõe a existência de ao menos dois modelos explanatórios: (1) todos os casos são resultantes de processos fisiopatológicos similares, todos com pequeno efeito e agindo de modo aditivo e interativo (o que acarretaria um enorme desafio para a pesquisa etiológica); e (2) grupos de casos representam duas ou mais populações de indivíduos que, ao fim e ao cabo, terminam por apresentar um fenótipo categórico semelhante.

2.3. Endofenótipos em psiquiatria: fundamentos e aplicações

Múltiplos desafios se colocam na investigação das bases biológicas de transtornos psiquiátricos. Talvez uma das principais questões que vem à tona seja a fragilidade das categorias diagnósticas, que se traduz, por exemplo, no caso dos estudos em

genética, em uma fragilidade na definição do fenótipo. Os manuais classificatórios hoje disponíveis baseiam-se, sobretudo, em dados fenomenológicos para a definição de categorias nosológicas. Além disso, apesar da crescente busca por evidências científicas para definição e caracterização dos diferentes transtornos psiquiátricos, muitos dos critérios adotados ainda não refletem mais do que opiniões de comitês.

Debates contemporâneos incluem discussões sobre qual modelo diagnóstico deva ser adotado nos sistemas classificatórios psiquiátricos. Dimensões conceituais definidoras das propriedades de um transtorno psiquiátrico estabelecem o paradigma de operacionalização de sistemas diagnósticos. Zachar e Kendler (2007) recentemente discutiram dimensões relevantes para o entendimento da natureza dos transtornos psiquiátricos; entre elas estavam os debates *causalismo versus descritivismo*, *essencialismo versus nominalismo* e *categorias versus contínuos*.

A definição médica tradicional de uma doença, baseada sobretudo no modelo de doenças infecciosas, prevê a identificação de agentes etiológicos discretos e únicos. A identificação de tais agentes no campo da psiquiatria, entretanto, não parece ser viável. Um enfoque alternativo propõe que o melhor entendimento acerca de uma determinada categoria nosológica pode ser obtido não através da busca de agentes causais, mas sim através da descrição precisa de seus elementos constitutivos. Essa abordagem fenomenológica pode ser tanto relativa (até a descoberta dos reais fatores etiológicos) quanto absoluta (assumindo a impossibilidade da identificação de agentes causais na psiquiatria).

O debate entre causalismo versus descritivismo está intimamente relacionado à discussão essencialismo versus nominalismo. Para um essencialista, categorias psiquiátricas existem independentemente dos sistemas nosológicos, cabendo a estes

a descoberta da real natureza dos transtornos para uma classificação acurada da realidade. Já os nominalistas não têm qualquer pretensão de identificar suas categorias com elementos da natureza; as mesmas não constituiriam mais do que instrumentos operacionais úteis na prática clínica. Uma posição intermediária, a dos chamados nominalistas moderados, reconheceria a importância da descoberta de fatos naturais acerca de transtornos psiquiátricos, mas também argumentaria que existem diferentes modos de classificar a realidade. Nesse modo de ver, classificação seria um exercício tanto de decisão quanto de descoberta (Zachar & Kendler, 2007).

Uma outra questão em aberto na definição nosológica em psiquiatria diz respeito aos limites dos transtornos. Seriam estes mais bem definidos como categorias discretas ou como graus de intensidade distintos de uma dada característica dimensional, presentes em diferentes medidas na população em geral? Um modelo categórico ou taxonômico não apenas prevê a existência de categorias qualitativamente independentes entre si, mas também de contrastes claros entre o normal e o patológico. Já um modelo baseado em contínuos propõe, baseado em doenças como hipertensão e osteoporose, por exemplo, que transtornos psiquiátricos são resultado de um conjunto de traços quantitativos, sendo os limites entre categorias não mais do que um reflexo de pontos de corte arbitrários.

Existe um grande hiato entre genes candidatos e sintomas manifestados por transtornos psiquiátricos como TDAH (tipicamente medidos por entrevistas clínicas ou escalas de avaliação), de modo que se torna desejável tanto conceitual quanto empiricamente a investigação de construtos que auxiliem na união desses pontos (Waldman 2005). O conceito de endofenótipos surge no campo da psiquiatria em 1967 (Gottesman & Shields). De acordo com sua definição na época, endofenótipos seriam “fenótipos internos identificáveis por testes bioquímicos ou exames microscópicos”.

Ficando adormecido por duas décadas, o uso do conceito foi retomado a partir da segunda metade da década de 1990 com a explosão dos estudos em genética molecular. Outros termos utilizados como sinônimos ou equivalentes ao conceito endofenótipos incluem fenótipos intermediários, marcadores biológicos, traços subclínicos, marcadores de vulnerabilidade (Gottesman faz uma distinção entre endofenótipos e marcadores biológicos na medida em que apenas aqueles teriam uma etiologia genética bem definida, constituindo um tipo especial destes).

A lógica por trás do emprego de endofenótipos na investigação das bases biológicas de transtornos psiquiátricos (bem como de qualquer doença ou traço complexo) está na tentativa de mendelização de fenótipos complexos. Desse modo, endofenótipos seriam idealmente monogênicos, representando fenótipos intermediários na cadeia causal entre genes e comportamentos e fornecendo alvos mais apropriados para estudos moleculares, de modo a permitir, em última análise, uma redução das variabilidades fenotípica e genotípica. Do ponto de vista metodológico, a característica mais importante de um endofenótipo é ser geneticamente menos complexo do que o fenótipo como um todo, estando mais próximo do produto gênico propriamente dito e fazendo parte de uma das vias fisiopatológicas para o transtorno como um todo.

Dado que genes têm como principal papel a codificação de proteínas, endofenótipos ideais seriam produtos protéicos. Sem a possibilidade desse tipo de análise na maioria dos transtornos psiquiátricos no momento, os endofenótipos utilizados até hoje incluem sintomas, dimensões ou outras características diagnósticas, bem como marcadores de neuroimagem, neurofisiologia, neuroquímica e neuropsicologia. Considerado um fator de risco para determinado transtorno, um endofenótipo pode estar presente em indivíduos que não apresentam o fenótipo pleno. Mais do que isso,

presume-se uma prevalência aumentada de endofenótipos entre familiares de indivíduos com o fenótipo completo se comparados com a população em geral.

Sendo um conceito ainda em construção, a literatura ainda debate sobre quais critérios devem ser preenchidos por determinado marcador para que o mesmo possa ser considerado um endofenótipo. Gottesman e Gould (2003) propõem que um endofenótipo deve (1) estar associado com o transtorno na população; (2) possuir herdabilidade significativa; (3) ser primariamente estado-independente, no sentido de manifestar-se independentemente da atividade do transtorno; (4) co-segregar com o transtorno em famílias; e (5) ser encontrado em familiares não afetados em uma frequência superior à da população geral. Já Waldman et al (2006) ampliaram os requisitos necessários para a definição de um endofenótipo. Além dos itens já elencados por Gottesman e Gould, endofenótipos também deveriam (6) ter boas propriedades psicométricas e, preferencialmente, distribuição normal; (7) possuir substratos genéticos em comum com o transtorno; (8) estar associados e/ou ligados a genes candidatos para o transtorno; (9) mediar a associação e/ou ligação entre genes candidatos e o transtorno; e (10) moderar a associação e/ou ligação entre genes candidatos e o transtorno.

A aplicação do conceito de endofenótipos no processo de identificação das bases biológicas do TDAH parece extremamente promissora. De acordo com os critérios de Wakefield (1992) para a definição de um construto válido, além de apresentar validade psicométrica e de acarretar prejuízo significativo, um transtorno também deve ser cientificamente identificável, i.e., apresentar disfunção em um processo psicológico ou biológico. A existência de heterogeneidade tanto no nível genotípico quanto no fenotípico torna necessária uma homogeneização das características do TDAH para sua melhor compreensão. A neuropsicologia aparece como uma

ferramenta de enorme valia para o refinamento fenotípico do transtorno, processo que visa, em última análise, à redução da complexidade genética das características fenomenológicas observadas.

A hipótese do prejuízo em funções executivas no TDAH constitui-se na teoria neuropsicológica com o maior número de estudos até o momento. Apesar de certamente não explicar ou englobar o transtorno como um todo, evidências de agregação familiar (Nigg, 2004; Crosbie & Schachar 2001), além de uma repercussão prognóstica negativa (Biederman et al, 2004; Biederman et al, 2006) convergem para a caracterização de um subgrupo TDAH com disfunção executiva (Nigg, 2005).

Esta dissertação tem como objetivo investigar a associação entre polimorfismos de alguns dos principais genes candidatos para o TDAH e o desempenho de crianças e adolescentes em medidas neuropsicológicas. A hipótese a ser testada é a da identificação, em uma amostra de pacientes com TDAH, de subgrupos genotípicos específicos com desempenho diferenciado em provas de funções executivas. Propõe-se que o refinamento fenotípico propiciará um aumento na sensibilidade a dimensões específicas do TDAH, facilitando a identificação de substratos biológicos do transtorno.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

- investigar o papel de polimorfismos de genes candidatos para o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) no desempenho de crianças e adolescentes com o transtorno em testes neuropsicológicos de funções executivas.

3.2. Objetivos específicos

- verificar a associação entre o polimorfismo VNTR do éxon III do gene para o receptor D4 de dopamina e o desempenho neuropsicológico de crianças e adolescentes com TDAH em testes de funções executivas;

- verificar a associação entre o polimorfismo -1021 C/T do gene para a enzima dopamina-beta-hidroxilase e o desempenho neuropsicológico de crianças e adolescentes com TDAH em testes de funções executivas.

4. Proteção dos direitos humanos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre como adendo à linha de pesquisa intitulada “Estudo do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade - suscetibilidade genética e genes candidatos”, protocolo 98201.

Referências

- American Psychiatric Association (APA). (1994). Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV. Washington DC: American Psychiatric Association.
- Arnsten, A. F. (in press). Catecholamine and Second Messenger Influences on Prefrontal Cortical Networks of “Representational Knowledge”: A Rational Bridge between Genetics and the Symptoms of Mental Illness. *Cereb Cortex*
- Barkley, R. A. (1997). Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: constructing a unifying theory of ADHD. *Psychol Bull*, 121(1), 65-94.
- Biederman, J., Faraone, S., Milberger, S., Guite, J., Mick, E., Chen, L., et al. (1996). A prospective 4-year follow-up study of attention-deficit hyperactivity and related disorders. *Arch Gen Psychiatry*, 53(5), 437-446.
- Biederman, J., Faraone, S. V., Keenan, K., Steingard, R., & Tsuang, M. T. (1991). Familial association between attention deficit disorder and anxiety disorders. *Am J Psychiatry*, 148(2), 251-256.
- Biederman, J., Monuteaux, M. C., Doyle, A. E., Seidman, L. J., Wilens, T. E., Ferrero, F., et al. (2004). Impact of executive function deficits and attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) on academic outcomes in children. *J Consult Clin Psychol*, 72(5), 757-766.
- Biederman, J., Petty, C., Fried, R., Fontanella, J., Doyle, A. E., Seidman, L. J., et al. (2006). Impact of psychometrically defined deficits of executive functioning in adults with attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry*, 163(10), 1730-1738.
- Casey, B. J., Nigg, J. T., & Durston, S. (2007). New potential leads in the biology and treatment of attention deficit-hyperactivity disorder. *Curr Opin Neurol*, 20(2), 119-124.
- Castellanos, F. X., Lee, P. P., Sharp, W., Jeffries, N. O., Greenstein, D. K., Clasen, L.

- S., et al. (2002). Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Jama*, 288(14), 1740-1748.
- Coghill, D., Nigg, J., Rothenberger, A., Sonuga-Barke, E., & Tannock, R. (2005). Whither causal models in the neuroscience of ADHD? *Dev Sci*, 8(2), 105-114.
- Crosbie, J., & Schachar, R. (2001). Deficient inhibition as a marker for familial ADHD. *Am J Psychiatry*, 158(11), 1884-1890.
- Cubells, J. F., & Zabetian, C. P. (2004). Human genetics of plasma dopamine beta-hydroxylase activity: applications to research in psychiatry and neurology. *Psychopharmacology (Berl)*, 174(4), 463-476.
- Faraone, S. V., & Doyle, A. E. (2001). The nature and heritability of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, 10(2), 299-316, viii-ix.
- Faraone, S. V., Perlis, R. H., Doyle, A. E., Smoller, J. W., Goralnick, J. J., Holmgren, M. A., et al. (2005). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 57(11), 1313-1323.
- Fischman, A. J., & Madras, B. K. (2005). The neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 57(11), 1374-1376.
- Frazier, T. W., Demaree, H. A., & Youngstrom, E. A. (2004). Meta-analysis of intellectual and neuropsychological test performance in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychology*, 18(3), 543-555.
- Gottesman, II, & Gould, T. D. (2003). The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry*, 160(4), 636-645.
- Gottesman, II, & Shields, J. (1967). A polygenic theory of schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58(1), 199-205.
- Klassen, A. F., Miller, A., & Fine, S. (2004). Health-related quality of life in children and adolescents who have a diagnosis of attention-deficit/hyperactivity

- disorder. *Pediatrics*, 114(5), e541-547.
- Lahey, B. B., Pelham, W. E., Loney, J., Kipp, H., Ehrhardt, A., Lee, S. S., et al. (2004). Three-year predictive validity of DSM-IV attention deficit hyperactivity disorder in children diagnosed at 4-6 years of age. *Am J Psychiatry*, 161(11), 2014-2020.
- Lezak, M. D. (1995). *Neuropsychological assessment* (3rd ed.). New York: Oxford University Press.
- Meyer-Lindenberg, A., Kohn, P. D., Kolachana, B., Kippenhan, S, McInerney-Leo, A., Nussbaum, R., et al. (2005). Midbrain dopamine and prefrontal function in humans: interaction and modulation by *COMT* genotype. *Nat Neurosci*, 8, 594-596.
- Nigg, J. T. (2005). Neuropsychologic theory and findings in attention-deficit/hyperactivity disorder: the state of the field and salient challenges for the coming decade. *Biol Psychiatry*, 57(11), 1424-1435.
- Nigg, J. T., Blaskey, L. G., Stawicki, J. A., & Sachek, J. (2004). Evaluating the endophenotype model of ADHD neuropsychological deficit: results for parents and siblings of children with ADHD combined and inattentive subtypes. *J Abnorm Psychol*, 113(4), 614-625.
- Nigg, J. T., Hinshaw, S. P., Carte, E. T., & Treuting, J. J. (1998). Neuropsychological correlates of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder: explainable by comorbid disruptive behavior or reading problems? *J Abnorm Psychol*, 107(3), 468-480.
- Nigg, J. T., Willcutt, E. G., Doyle, A. E., & Sonuga-Barke, E. J. (2005). Causal heterogeneity in attention-deficit/hyperactivity disorder: do we need neuropsychologically impaired subtypes? *Biol Psychiatry*, 57(11), 1224-1230.
- Pennington, B. F. (2005). Toward a new neuropsychological model of attention-deficit/hyperactivity disorder: subtypes and multiple deficits. *Biol Psychiatry*,

57(11), 1221-1223.

Polanczyk, G., de Lima, M. S., Horta, B. L., Biederman, J., & Rohde, L. A. (2007).

The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry*, 164(6), 942-948.

Rohde, L. A. (2002). ADHD in Brazil: the DSM-IV criteria in a culturally different population. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 41(9), 1131-1133.

Sagvolden, T., Aase, H., Zeiner, P., & Berger, D. (1998). Altered reinforcement mechanisms in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Behav Brain Res*, 94(1), 61-71.

Solanto, M. V., Abikoff, H., Sonuga-Barke, E., Schachar, R., Logan, G. D., Wigal, T., et al. (2001). The ecological validity of delay aversion and response inhibition as measures of impulsivity in AD/HD: a supplement to the NIMH multimodal treatment study of AD/HD. *J Abnorm Child Psychol*, 29(3), 215-228.

Sonuga-Barke, E. J. (2005). Causal models of attention-deficit/hyperactivity disorder: from common simple deficits to multiple developmental pathways. *Biol Psychiatry*, 57(11), 1231-1238.

Swensen, A., Birnbaum, H. G., Ben Hamadi, R., Greenberg, P., Cremieux, P. Y., & Secnik, K. (2004). Incidence and costs of accidents among attention-deficit/hyperactivity disorder patients. *J Adolesc Health*, 35(4), 346 e341-349.

Valera, E. M., Faraone, S. V., Murray, K. E., & Seidman, L. J. (2007). Meta-analysis of structural imaging findings in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 61(12), 1361-1369.

Wakefield, J. C. (1992). The concept of mental disorder. On the boundary between biological facts and social values. *Am Psychol*, 47(3), 373-388.

Waldman, I. D., Nigg, J. T., Gizer, I. R., Park, L., Rappley, M. D., & Friderici, K. (2006). The adrenergic receptor alpha-2A gene (ADRA2A) and

- neuropsychological executive functions as putative endophenotypes for childhood ADHD. *Cogn Affect Behav Neurosci*, 6(1), 18-30.
- Wilens, T. E. (2004). Attention-deficit/hyperactivity disorder and the substance use disorders: the nature of the relationship, subtypes at risk, and treatment issues. *Psychiatr Clin North Am*, 27(2), 283-301.
- Willcutt, E. G., Doyle, A. E., Nigg, J. T., Faraone, S. V., & Pennington, B. F. (2005). Validity of the executive function theory of attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Biol Psychiatry*, 57(11), 1336-1346.
- World Health Organization. (1996). *Multiaxial classification of child and adolescent psychiatric disorders : the ICD-10 classification of mental and behavioural disorders in children and adolescents*. Cambridge ; New York: Cambridge University Press.
- Zachar, P., & Kendler, K. S. (2007). Psychiatric disorders: a conceptual taxonomy. *Am J Psychiatry*, 164(4), 557-565.

5. Artigo 1

5.1. Versão em inglês

ASSOCIATION BETWEEN DRD4 GENE AND PERFORMANCE OF CHILDREN WITH ADHD IN A TEST OF SUSTAINED ATTENTION

Christian Kieling BA¹, Tatiana Roman PhD³, Alysa E. Doyle PhD⁴,
Mara Helena Hutz PhD², and Luis Augusto Rohde MD¹

¹ Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

² Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

³ Departamento de Ciências Morfológicas, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Brasil

⁴ Departamento de Psiquiatria, Universidade Harvard, Boston, Massachusetts

Key Words: Attention-deficit/hyperactivity disorder; child; continuous performance test; dopamine D4 receptor; genetics; neuropsychology

This work was partially supported by research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) (Grants 471761/03-6 and 300226/2002-0), and Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

We thank Heloisa Kaefer, Márcia Knijnik, and Natália Soncini for conducting neuropsychological testing.

Received 1 October 2005; revised 19 April 2006; accepted 21 April 2006. Available online 15 June 2006. Published in **Biological Psychiatry** 2006 Nov 15;60(10):1163-5.

Background

The adoption of neuropsychological tests as endophenotypic measures can provide an increased sensitivity to specific dimensions of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD).

Methods

The association between a variable number of tandem repeats polymorphism at the dopamine D4 receptor gene (DRD4) and the performance of children and adolescents with ADHD in a continuous performance test (CPT) was evaluated. The sample comprised 90 clinically referred children and adolescents with ADHD. Errors of omission and commission in the CPT were computed and the number of 48-base pairs tandem repeats in the exon III of DRD4 was assessed.

Results

The presence of a 7-repeat allele was associated with more errors of commission and the homozygosity of the 4-repeat allele was related to fewer errors of commission and omission even after adjusting for age.

Conclusions

These findings bring further evidence on the role of DRD4 polymorphisms on the performance in sustained attention tasks among children and adolescents with ADHD diagnosis.

Introduction

The molecular basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) still remains unknown, despite its high heritability estimates (Biederman and Faraone 2005). This may be due to its complex nature, both at the genotypic (multiple genes) and the phenotypic (phenomenological heterogeneity) levels. Supported by neurobiological findings, the most investigated neurotransmitter system is the dopaminergic (Bobb et al 2005). Although there is no clear consensus, a meta-analysis conducted by Faraone et al (2001) evidenced a significant role for the dopamine D4 receptor (DRD4) gene, specifically the 7-repeat allele of the exon III variable number of tandem repeats (VNTR), in the etiology of ADHD.

One hypothesis that could explain the lack of consistency in the literature is the great variability in the phenotypic definition of ADHD based on DSM-IV criteria (American Psychiatric Association 1994). The augmentation of categorical descriptions by quantitative measures strengthens the assessment of genetic underpinnings, affording more straightforward association studies (Gottesman and Gould 2003 and Sergeant 2005).

The adoption of neuropsychological tests as endophenotypic measurements might enhance the power of genetic studies since it may provide an increased sensitivity to specific dimensions of ADHD (Doyle et al 2005). Thus far, only a small number of studies have assessed the role of DRD4 polymorphisms and performance on neurocognitive measures in individuals with ADHD. Results have been variable, with one study showing an association between the DRD4 7-repeat allele and an impulsive, error-prone response style (Langley et al 2004) and two studies showing greater

inattention, impulsivity, and reaction time anomalies in individuals without the 7-repeat allele (Swanson et al 2000 and Manor et al 2002).

Continuous performance tests (CPTs) assess the maintenance of focused attention while responding to target stimuli and the inhibition of responses to non-target stimuli. In a recent meta-analytic review, Frazier et al (2004) showed that CPT scores achieved the largest effect size for the diagnosis of ADHD. The aim of this study was to evaluate the association between the most investigated candidate gene for ADHD (DRD4) and performance on a CPT in a large, well-characterized sample of children and adolescents from Brazil.

Methods and Materials

Subjects

The sample consisted of 90 children and adolescents referred to the ADHD outpatient clinic at our University Hospital (HCPA). Inclusion criteria were: 1) age between 7 and 17 years; 2) ADHD diagnosis according to DSM-IV; 3) drug naïve patients; and 4) $IQ \geq 70$. The only exclusion criterion was the presence of clinical conditions that might interfere with the test, including blindness, deafness, pervasive developmental disorder, and other major neurological disorders. No child, however, met such exclusion criteria. ADHD and comorbid diagnoses were achieved through a three-stage process: 1) evaluation with a semi-structured interview (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children, Epidemiological Version - K-SADS-E; Orvaschel 1985), modified to assess DSM-IV criteria and applied to parents by trained research assistants, whose inter-rater reliability for the ADHD diagnosis had been previously evaluated (kappas from .77 to 1.00, $p < .001$); 2) discussion of each

diagnosis derived through the K-SADS-E in a clinical committee chaired by a senior psychiatrist (LAR); and 3) clinical evaluation of ADHD and comorbid conditions using DSM-IV criteria by a child psychiatrist who had previously received the K-SADS-E results. When a diagnostic disagreement occurred in the three-stage process, priority was given for diagnoses obtained through clinical interviews (Rohde et al 2005). Severity of ADHD symptoms was assessed with the Swanson, Nolan, and Pelham (SNAP-IV) rating scale (Swanson et al 2001). Parents provided written informed consent and children or adolescents gave verbal assent to participate. The Ethical Committee of HCPA approved this investigation.

Neuropsychological Assessment

Full Scale IQ was estimated from vocabulary and block design subtests of the Wechsler Intelligence Scale for Children-Third Edition (Wechsler 1991), administered by trained psychologists. Subjects performed a simplified version of the CPT (Cornblatt et al 1988). Testing was implemented using standardized procedures, including same software and raters. A series of numbers, from 1 to 9, appeared randomly, one at a time, with a fixed interval, on the computer screen. Subjects were required to press a button whenever the number 6 appeared. Omission (missed targets) and commission (incorrect targets) errors were computed and adjusted respectively for the number of times the selected and other digits appeared.

Genotyping

High molecular weight genomic DNA was extracted from whole blood by a salting-out procedure (Lahiri and Nurnberger 1991). The DRD4 exon III region containing the 48-

base pair VNTR polymorphism was amplified by polymerase chain reaction as described by Roman et al (1999).

Data Analysis

Comparison among categorical variables was performed using chi-square or Fisher's exact test. All continuous variables showing a normal distribution were compared between the groups by Student *T* test; for those variables (e.g., CPT measures) that did not show a normal distribution, non-parametric tests were used (Mann-Whitney *U* test). The significance level accepted was .05. Potential confounders evaluated were age, sex, ethnic background, ADHD subtype, severity of symptoms (SNAP-IV scores), IQ, setting for data collection, and comorbidity (mood, anxiety, and disruptive behavior disorders). A confounder was defined as a variable associated with both independent and dependent variables ($p \leq .2$). Only age, despite significant overlap between genotypic groups, met the criteria for a confounder and was included in adjusted analyses. In order to obtain a normal distribution, CPT scores were ranked before inclusion in the analysis of variance (Montgomery 1997). All tests were two-tailed.

Results

Sample Characteristics

Ninety children and adolescents were assessed. Mean age was 10.9 (SD = 2.8) years, and mean IQ was 94 (SD = 12). Most of the sample was of European ancestry (95.2%) and males (74.4%). The ADHD combined type was the most prevalent (69.7%), and oppositional defiant disorder was the most common comorbid condition (41.1%).

Subgroup analyses according to genotype showed that mean age was 9.77 years (SD = 2.66) for children in the 7-repeat group and 11.34 (SD = 2.79) for those without the allele. Children with two 4-repeat alleles had a mean age of 11.35 years (SD = 2.72) while those without homozygosity had a mean of 10.36 (SD = 2.87).

Neuropsychological Performance

There were differences on CPT scores among different genotypic groups after adjusting for age (Table 1). The presence of a 7-repeat allele was associated with more commission errors ($F = 4.55$, $df = 1$, $p = .036$). In the same direction, subjects with two copies of the 4-repeat allele made fewer errors of both commission ($F = 5.94$, $df = 1$, $p = .017$) and omission ($F = 5.23$, $df = 1$, $p = .025$). Severity of symptoms (SNAP-IV scores), albeit not fulfilling statistical criteria for a potential confounder, was included in additional analyses and did not significantly affect any results (data available upon request).

Discussion

Our data suggest an association between the DRD4 genotype and CPT performance in children and adolescents with ADHD. Youths with one or more 7-repeat alleles gave more impulsive responses, while 4-repeat homozygosity was associated with reduced errors of both inattention and impulsivity. Neurochemical mechanisms may underlie such contrast, given that the receptors expressed by the non-4-repeat alleles show a suboptimal response to dopamine (Wang et al 2004).

The present work should be interpreted in the context of some limitations. First, a small number of neuropsychological outcomes were evaluated. Second, we cannot

exclude haplotype heterogeneity among alleles with the same number of repeats. However, the robustness of our findings is supported by the conservative data analyses and the fact that ours is a drug-naïve sample. The impact of medication is a potential confounder not frequently considered in previous studies.

Our results provide a constructive replication of a previous study (Langley et al 2004) and go a step further to identify a significant difference in CPT performance according to DRD4 status within the ADHD diagnosis. We not only evaluated the impact of the 7-repeat allele, but also demonstrated the protective effect of the 4-repeat allele. These findings add further evidence on the role of DRD4 polymorphisms on the performance of children and adolescents in sustained attention tasks that cannot be explained by the severity of the ADHD symptoms.

References

- American Psychiatric Association 1994 American Psychiatric Association, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (4th ed.), American Psychiatric Press, Washington, DC (1994).
- Biederman and Faraone 2005 J. Biederman and S.V. Faraone, Attention-deficit hyperactivity disorder, *Lancet* **366** (2005), pp. 237-248.
- Bobb et al 2005 A.J. Bobb, F.X. Castellanos, A.M. Addington and J.L. Rapoport, Molecular genetic studies of ADHD: 1991 to 2004, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **132** (2005), pp. 109-125.
- Cornblatt et al 1988 B.A. Cornblatt, N.J. Risch, G. Faris, D. Friedman and L. Erlenmeyer-Kimling, The Continuous Performance Test, identical pairs version (CPT-IP): I New findings about sustained attention in normal families, *Psychiatry Res* **26** (1988), pp. 223-238.
- Doyle et al 2005 A.E. Doyle, S.V. Faraone and L.J. Seidman *et al.*, Are endophenotypes based on measures of executive functions useful for molecular genetic studies of ADHD?, *J Child Psychol Psychiatry* **46** (2005), pp. 774-803.
- Faraone et al 2001 S.V. Faraone, A.E. Doyle, E. Mick and J. Biederman, Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder, *Am J Psychiatry* **158** (2001), pp. 1052-1057.
- Frazier et al 2004 T.W. Frazier, H.A. Demaree and E.A. Youngstrom, Meta-analysis of intellectual and neuropsychological test performance in attention-deficit/hyperactivity disorder, *Neuropsychology* **18** (2004), pp. 543-555.

- Gottesman and Gould 2003 I.I. Gottesman and T.D. Gould, The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions, *Am J Psychiatry* **160** (2003), pp. 636-645.
- Lahiri and Nurnberger 1991 D.K. Lahiri and J.I. Nurnberger Jr, A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic Acids Res* **19** (1991), p. 5444.
- Langley et al 2004 K. Langley, L. Marshall and M. van den Bree *et al.*, Association of the dopamine D4 receptor gene 7-repeat allele with neuropsychological test performance of children with ADHD, *Am J Psychiatry* **161** (2004), pp. 133-138.
- Manor et al 2002 I. Manor, S. Tyano, J. Eisenberg, R. Bachner-Melman, M. Kotler and R.P. Ebstein, The short DRD4 repeats confer risk to attention deficit hyperactivity disorder in a family-based design and impair performance on a continuous performance test (TOVA), *Mol Psychiatry* **7** (2002), pp. 790-794.
- Montgomery 1997 D.C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments* (4th ed.), Wiley, New York (1997).
- Orvaschel 1985 H. Orvaschel, Psychiatric interviews suitable for use in research with children and adolescents, *Psychopharmacol Bull* **21** (1985), pp. 737-745.
- Rohde et al 2005 L.A. Rohde, C. Szobot, G. Polanczyk, M. Schmitz, S. Martins and S. Tramontina, Attention-deficit/hyperactivity disorder in a diverse culture: do research and clinical findings support the notion of a cultural construct for the disorder?, *Biol Psychiatry* **57** (2005), pp. 1436-1441.
- Roman et al 1999 T. Roman, C.H.D. Bau, S. Almeida and M.H. Hutz, Lack of association of the dopamine D4 receptor gene polymorphism with alcoholism in a Brazilian population, *Addict Biology* **4** (1999), pp. 203-207.
- Sergeant 2005 J. Sergeant, Are we ready for endophenotypes in attention deficit hyperactivity disorder?, *Rev Bras Psiquiatr* **27** (2005), pp. 262-263.

- Swanson et al 2000 J. Swanson, J. Oosterlaan and M. Murias *et al.*, Attention deficit/hyperactivity disorder children with a 7-repeat allele of the dopamine receptor D4 gene have extreme behavior but normal performance on critical neuropsychological tests of attention, *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (2000), pp. 4754-4759.
- Swanson et al 2001 J.M. Swanson, H.C. Kraemer and S.P. Hinshaw *et al.*, Clinical relevance of the primary findings of the MTA: success rates based on severity of ADHD and ODD symptoms at the end of treatment, *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **40** (2001), pp. 168-179.
- Wang et al 2004 E. Wang, Y.C. Ding and P. Flodman *et al.*, The genetic architecture of selection at the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene locus, *Am J Hum Genet* **74** (2004), pp. 931-944.
- Wechsler 1991 D. Wechsler, *WISC-III : Wechsler Intelligence Scale for Children: Manual* (3rd ed), Psychological Corp., Harcourt Brace Jovanovich, San Antonio (1991).

Table 1. Scores for omission and commission errors on the Continuous Performance Test according to DRD4 genotype

	n	Score		Unadjusted analysis		Adjusted analysis*	
		Median	Range	Z	p	F	P
Omission errors							
7-repeat present	26	0.200	0.754	-3.12	0.002	0.49	0.485
7-repeat absent	64	0.073	0.911				
4-repeat homozygosity	48	0.070	0.911	-2.85	0.004	5.23	0.025
4-repeat homozygosity	42	0.192	0.875				
Commission errors							
7-repeat present	26	0.019	0.100	-2.15	0.036	4.54	0.036
7-repeat absent	64	0.007	0.165				
4-repeat homozygosity	48	0.006	0.165	-2.75	0.006	5.94	0.017
4-repeat homozygosity	42	0.012	0.100				

*Adjustment for age; DRD4: dopamine D4 receptor gene.

5.2. Versão em português

ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENE DRD4 E O DESEMPENHO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM TDAH EM UM TESTE DE ATENÇÃO SUSTENTADA

Christian Kieling BA¹, Tatiana Roman PhD³, Alysya E. Doyle PhD⁴,
Mara Helena Hutz PhD², and Luis Augusto Rohde MD¹

¹ Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre

² Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre

³ Departamento de Ciências Morfológicas, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

⁴ Departamento de Psiquiatria, Universidade Harvard, Boston, Massachusetts

Palavras-chave: transtorno de déficit de atenção e hiperatividade; criança; teste de desempenho continuado; receptor D4 de dopamina; genética; neuropsicologia

Este trabalho foi parcialmente financiado por verbas de pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processos 471761/03-6 e 300226/2002-0), e Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Agradecemos Heloisa Kaefer, Márcia Knijnik e Natália Soncini pela condução da testagem neuropsicológica.

Recebido 1 de outubro de 2005; revisado 19 de abril de 2006; aceito 21 de abril de 2006. Disponível online 15 de junho de 2006. Publicado em 15 de novembro de 2006 no periódico **Biological Psychiatry** 60(10):1163-5.

Fundamentação

A adoção de testes neuropsicológicos como medidas endofenotípicas pode fornecer uma sensibilidade aumentada a dimensões específicas do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH).

Métodos

Avaliou-se a associação entre um polimorfismo de número variável de repetições em tandem no gene para o receptor D4 de dopamina (DRD4) e o desempenho de crianças e adolescentes com TDAH em um teste de desempenho continuado (CPT). A amostra foi composta por 90 crianças e adolescentes com TDAH referidas para acompanhamento clínico. Erros de omissão e de comissão no CPT foram computados e o número de repetições em tandem de 48 pares de base no éxon III do DRD4 foi medido.

Resultados

A presença do alelo de 7 repetições esteve associada a um número maior de erros de comissão, enquanto que a homozigose do alelo de 4 repetições esteve relacionada a um número menor de erros de comissão e de omissão mesmo após o ajuste para idade.

Conclusões

Tais achados fornecem evidência adicional para o papel de polimorfismos do DRD4 no desempenho em tarefas de atenção sustentada entre crianças e adolescentes com o diagnóstico de TDAH.

Introdução

As bases moleculares do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) ainda não estão claras, apesar de suas altas estimativas de herdabilidade (Biederman & Faraone, 2005). Isto pode se dever à sua natureza complexa, tanto em nível genotípico (múltiplos genes) quanto fenotípico (heterogeneidade fenotípica). Baseando-se em achados neurobiológicos, o sistema neurotransmissor mais investigado tem sido o dopaminérgico (Bobb et al, 2005). Apesar de não haver um consenso inequívoco, uma metanálise conduzida por Faraone et al (2001) evidenciou um papel significativo para o gene do receptor D4 de dopamina (DRD4), especificamente para o alelo de 7 repetições do polimorfismo de número variável de repetições em tandem (VNTR) do éxon III, na etiologia do TDAH.

Uma hipótese que pode explicar a carência de consistência na literatura é a grande variabilidade na definição fenotípica do TDAH baseada nos critérios do DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994). A potencialização de descrições categóricas por medidas quantitativas fortalece a avaliação de substratos genéticos, proporcionando estudos de associação mais diretos (Gottesman & Gould, 2003 e Sergeant, 2005).

A adoção de testes neuropsicológicos como medidas endofenotípicas por aumentar o poder de estudos em genética ao prover uma sensibilidade aumentada a dimensões específicas do TDAH (Doyle et al, 2005). Até agora, apenas um pequeno número de estudos avaliou o papel de polimorfismos do DRD4 no desempenho em tarefas cognitivas em indivíduos com TDAH. Os resultados foram diversos, com um estudo mostrando associação do alelo de 7 repetições do DRD4 com um estilo de respostas impulsivo e

errático (Langley et al, 2004) e dois estudos mostrando maior desatenção, impulsividade e anomalias em tempo de reação entre indivíduos *sem* o alelo de 7 repetições (Swanson et al, 2000 e Manor et al, 2002).

Testes de desempenho continuado (CPTs) avaliam a manutenção de atenção focada durante a resposta a estímulos alvo e a inibição de respostas a estímulos não-alvo. Em uma recente revisão metanalítica, Frazier et al (2004) demonstraram que escores de CPT atingem os maiores tamanhos de efeito para o diagnóstico de TDAH. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre o gene candidato mais investigado no TDAH (DRD4) e o desempenho em um CPT em uma amostra de crianças e adolescentes com TDAH no Brasil.

Materiais e métodos

Sujetos

A amostra foi composta por 90 crianças e adolescentes referidos para o ambulatório de TDAH do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os critérios de inclusão foram os seguintes: 1) idade entre 7 e 17 anos; 2) diagnóstico de TDAH conforme critérios do DSM-IV; 3) pacientes sem uso prévio de psicofármacos; e 4) QI estimado ≥ 70 . O único critério de exclusão foi a presença de doenças clínicas que pudessem interferir com a realização da testagem, tais como cegueira, surdez, transtorno global do desenvolvimento e outras doenças neurológicas relevantes. Nenhuma criança enquadrou-se em tais critérios de exclusão. TDAH e diagnósticos comórbidos foram investigados através de um processo em três estágios: 1) avaliação em entrevista semi-estruturada (Schedule for Affective

Disorders and Schizophrenia for School-Age Children, Epidemiological Version - K-SADS-E; Orvaschel, 1985), modificada para avaliar critérios DSM-IV e aplicada a pais de pacientes por assistentes de pesquisa treinados, cuja confiabilidade para o diagnóstico de TDAH havia sido avaliada previamente (valores kappa variando de 0,77 a 1,00, $p < 0,001$); 2) discussão de cada diagnóstico obtido através do K-SADS-E em comitê clínico comandado por psiquiatra sênior (LAR); e 3) avaliação clínica de TDAH e condições comórbidas utilizando critérios operacionais do DSM-IV por psiquiatra da infância e adolescência, o qual recebia os resultados obtidos no K-SADS-E. Na ocorrência de discordância diagnóstica durante o processo de três estágios, prioridade era dada aos diagnósticos obtidos em entrevista clínica (Rohde et al, 2005). A intensidade de sintomas do TDAH foi avaliada com a escala de Swanson, Nolan, and Pelham (SNAP-IV) (Swanson et al, 2001). Pais forneceram consentimento informado por escrito, e crianças e adolescentes concordaram verbalmente em participar deste estudo. O Comitê de Ética do HCPA aprovou esta investigação.

Avaliação neuropsicológica

O QI foi estimado a partir dos subtestes de vocabulário e de cubos da escala Wechsler Intelligence Scale for Children - Third Edition (Wechsler, 1991), administrada por psicólogas treinadas. Os sujeitos realizaram uma versão simplificada do CPT (Cornblatt et al, 1988). A testagem foi feita utilizando procedimentos padronizados, incluindo o mesmo software e avaliadoras. Uma série de números, de 1 a 9, aparecia aleatoriamente, um de cada vez, em intervalos fixos, em uma tela de computador. Os sujeitos eram requisitados a apertar uma tecla sempre que o número 6 aparecesse. Erros de omissão (alvos perdidos) e de comissão (alvos incorretos) foram computados e

ajustados respectivamente para o número de vezes que o número escolhido e os demais apareciam.

Genotipagem

DNA genômico de alto peso foi extraído do sangue por um procedimento de *salting-out* (Lahiri and Nurnberger, 1991). A região do éxon III do DRD4 contendo o polimorfismo VNTR de 48 pares de base foi amplificada por reação em cadeia da polimerase como descrito por Roman et al (1999).

Análise de dados

Comparações entre variáveis categóricas foram realizadas utilizando qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Todas as variáveis contínuas apresentando distribuição normal foram comparadas entre grupos pelo teste T de Student; para aquelas variáveis (e.g., medidas do CPT) que não apresentaram distribuição normal, testes não-paramétricos foram usados (teste *U* de Mann-Whitney). O nível de significância foi estabelecido em 0,05. Potenciais confundidores avaliados foram idade, sexo, etnia, subtipo de TDAH, intensidade de sintomas (escores SNAP-IV), QI, e comorbidades (humor, ansiedade, e transtornos externalizantes). Definiu-se como confundidor aquela variável associada simultaneamente com as variáveis dependente e independente ($p \leq 0,02$). Apenas idade, apesar de apresentar grande sobreposição ente grupos genotípicos, preencheu critérios para confundidor, sendo assim incluída nas análises ajustadas. Para obtenção de distribuição normal, escores do CPT foram ranqueados antes da inclusão na análise de variância (Montgomery, 1997). Todos os testes foram bi-caudais.

Resultados

Características da amostra

Noventa crianças e adolescentes foram avaliados. A média de idade foi de 10,9 (DP = 2,8) anos, e o QI médio foi de 94 (DP = 12). A maior parte da amostra era de ancestralidade europeia (95,2%) e masculina (74,4%). O subtipo combinado de TDAH foi o mais prevalente (69,7%), e o transtorno e oposição e desafio foi a condição comórbida mais comum (41,1%). Análises de subgrupo de acordo com genótipo mostraram que a média de idade foi de 9,77 anos (DP = 2,66) para crianças no grupo de 7 repetições e de 11,34 (DP = 2,79) para aqueles sem o alelo. Crianças com duas cópias do alelo de 4 repetições tinham uma média de idade 11,35 anos (DP = 2,72), enquanto que aquelas sem a homozigose tinham uma média de 10,36 (DP = 2,87).

Desempenho neuropsicológico

Observou-se diferenças nos escores do CPT entre os diferentes grupos genotípicos após o ajuste para idade (Tabela 1). A presença de um alelo de 7 repetições esteve associada a um número maior de erros por comissão ($F = 4,55$, $df = 1$, $p = 0,036$). Na mesma direção, sujeitos com duas cópias do alelo de 4 repetições cometeram menos erros tanto por comissão ($F = 5,94$, $df = 1$, $p = 0,017$) quanto por omissão ($F = 5,23$, $df = 1$, $p = 0,025$). Intensidade de sintomas (escores SNAP-IV), apesar de não preencher critérios estatísticos para potencial confundidor, foi incluída em análises adicionais e não afetou significativamente os resultados (dados não apresentados).

Discussão

Nossos dados sugerem uma associação entre o genótipo DRD4 e o desempenho no CPT em crianças e adolescentes com TDAH. Jovens com um ou mais alelos de 7 repetições deram mais respostas impulsivas, enquanto que a homozigose de 4 repetições esteve associada com um número menor de erros tanto de desatenção quanto de impulsividade. Mecanismos neuroquímicos podem subjazer tal contraste, dado que receptores expressados por alelos não-4 apresentam uma resposta subótima ao estímulo dopaminérgico (Wang et al, 2004).

O presente trabalho deve ser interpretado no contexto de alguma limitações. Primeiramente, um número reduzido de desfechos neuropsicológicos foi avaliado. Além disso, nós não podemos excluir heterogeneidade haplotípica entre alelos com o mesmo número de repetições. Contudo, a robustez de nosso achados é reforçada pela análise conservadora de dados e pelo fato de que nossa amostra era virgem de psicofármacos. O impacto da medicação no desempenho neuropsicológico é um potencial confundidor não considerados em todos os estudos prévios.

Nossos resultados fornecem uma replicação construtiva de um estudo anterior (Langley et al, 2004) e vão um passo além ao identificar uma diferença significativa no desempenho no CPT de acordo com o genótipo DRD4 dentro do diagnóstico TDAH. Nós não apenas avaliamos o impacto do alelo de 7 repetições, mas também demonstramos o efeito protetor do alelo de 4 repetições. Tais achados trazem evidência adicional para o papel de polimorfismos do DRD4 no desempenho de crianças e adolescentes em um teste de atenção sustentada que não pode ser explicado pela intensidade de sintomas do

TDAH.

Referências

- American Psychiatric Association 1994 American Psychiatric Association, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (4th ed.), American Psychiatric Press, Washington, DC (1994).
- Biederman and Faraone 2005 J. Biederman and S.V. Faraone, Attention-deficit hyperactivity disorder, *Lancet* **366** (2005), pp. 237-248.
- Bobb et al 2005 A.J. Bobb, F.X. Castellanos, A.M. Addington and J.L. Rapoport, Molecular genetic studies of ADHD: 1991 to 2004, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **132** (2005), pp. 109-125.
- Cornblatt et al 1988 B.A. Cornblatt, N.J. Risch, G. Faris, D. Friedman and L. Erlenmeyer-Kimling, The Continuous Performance Test, identical pairs version (CPT-IP): I New findings about sustained attention in normal families, *Psychiatry Res* **26** (1988), pp. 223-238.
- Doyle et al 2005 A.E. Doyle, S.V. Faraone and L.J. Seidman *et al.*, Are endophenotypes based on measures of executive functions useful for molecular genetic studies of ADHD?, *J Child Psychol Psychiatry* **46** (2005), pp. 774-803.
- Faraone et al 2001 S.V. Faraone, A.E. Doyle, E. Mick and J. Biederman, Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder, *Am J Psychiatry* **158** (2001), pp. 1052-1057.
- Frazier et al 2004 T.W. Frazier, H.A. Demaree and E.A. Youngstrom, Meta-analysis of intellectual and neuropsychological test performance in attention-deficit/hyperactivity disorder, *Neuropsychology* **18** (2004), pp. 543-555.

- Gottesman and Gould 2003 I.I. Gottesman and T.D. Gould, The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions, *Am J Psychiatry* **160** (2003), pp. 636-645.
- Lahiri and Nurnberger 1991 D.K. Lahiri and J.I. Nurnberger Jr, A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic Acids Res* **19** (1991), p. 5444.
- Langley et al 2004 K. Langley, L. Marshall and M. van den Bree *et al.*, Association of the dopamine D4 receptor gene 7-repeat allele with neuropsychological test performance of children with ADHD, *Am J Psychiatry* **161** (2004), pp. 133-138.
- Manor et al 2002 I. Manor, S. Tyano, J. Eisenberg, R. Bachner-Melman, M. Kotler and R.P. Ebstein, The short DRD4 repeats confer risk to attention deficit hyperactivity disorder in a family-based design and impair performance on a continuous performance test (TOVA), *Mol Psychiatry* **7** (2002), pp. 790-794.
- Montgomery 1997 D.C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments* (4th ed.), Wiley, New York (1997).
- Orvaschel 1985 H. Orvaschel, Psychiatric interviews suitable for use in research with children and adolescents, *Psychopharmacol Bull* **21** (1985), pp. 737-745.
- Rohde et al 2005 L.A. Rohde, C. Szobot, G. Polanczyk, M. Schmitz, S. Martins and S. Tramontina, Attention-deficit/hyperactivity disorder in a diverse culture: do research and clinical findings support the notion of a cultural construct for the disorder?, *Biol Psychiatry* **57** (2005), pp. 1436-1441.
- Roman et al 1999 T. Roman, C.H.D. Bau, S. Almeida and M.H. Hutz, Lack of association of the dopamine D4 receptor gene polymorphism with alcoholism in a Brazilian population, *Addict Biology* **4** (1999), pp. 203-207.

- Sergeant 2005 J. Sergeant, Are we ready for endophenotypes in attention deficit hyperactivity disorder?, *Rev Bras Psiquiatr* 27 (2005), pp. 262-263.
- Swanson et al 2000 J. Swanson, J. Oosterlaan and M. Murias *et al.*, Attention deficit/hyperactivity disorder children with a 7-repeat allele of the dopamine receptor D4 gene have extreme behavior but normal performance on critical neuropsychological tests of attention, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), pp. 4754-4759.
- Swanson et al 2001 J.M. Swanson, H.C. Kraemer and S.P. Hinshaw *et al.*, Clinical relevance of the primary findings of the MTA: success rates based on severity of ADHD and ODD symptoms at the end of treatment, *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40 (2001), pp. 168-179.
- Wang et al 2004 E. Wang, Y.C. Ding and P. Flodman *et al.*, The genetic architecture of selection at the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene locus, *Am J Hum Genet* 74 (2004), pp. 931-944.
- Wechsler 1991 D. Wechsler, *WISC-III : Wechsler Intelligence Scale for Children: Manual* (3rd ed), Psychological Corp., Harcourt Brace Jovanovich, San Antonio (1991).

Tabela 1. Escores para erros por omissão e por comissão no CPT de acordo com o genótipo DRD4

	n	Escore		Análise bruta		Análise ajustada*	
		Mediana	Intervalo	Z	P	F	P
Erros por omissão							
7 repetições presente	26	0,200	0,754	-3,12	0,002	0,49	0,485
7 repetições ausente	64	0,073	0,911				
Homozigose 4 repetições	48	0,070	0,911	-2,85	0,004	5,23	0,025
Homozigose 4 repetições	42	0,192	0,875				
Erros por comissão							
7 repetições presente	26	0,019	0,100	-2,15	0,036	4,54	0,036
7 repetições ausente	64	0,007	0,165				
Homozigose 4 repetições	48	0,006	0,165	-2,75	0,006	5,94	0,017
Homozigose 4 repetições	42	0,012	0,100				

*Ajuste para idade; CPT: teste de desempenho continuado; DRD4: gene para o receptor D4 de dopamina.

6. Artigo 2

THE -1021 C/T DBH POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH NEUROPSYCHOLOGICAL PERFORMANCE AMONG CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH ADHD

Christian Kieling¹, Júlia P. Genro², Mara H. Hutz², and Luis Augusto Rohde¹

¹Department of Psychiatry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre

²Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre

Running head:
DBH and neuropsychology in ADHD

Correspondence to:

Dr. Luis Augusto Rohde (lrohde@terra.com.br)

Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 Porto Alegre, 90035-003, RS, Brazil.

Submitted for publication in the **American Journal of Medical Genetics: Part B, Neuropsychiatric Genetics** on May 8, 2007.

Abstract:

Catecholaminergic imbalance has increasingly been implicated in the pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). The enzyme dopamine-beta-hydroxylase (DBH) - critical to catecholaminergic regulation - is under strong genetic control, with the -1021 C/T polymorphism accounting for up to 50% of the enzymatic activity. This work aimed to investigate association between this functional polymorphism and the performance of children and adolescents with ADHD in neuropsychological measures of executive function (EF). Sixty-four drug-naïve patients with ADHD undertook a Continuous Performance Test and the Wisconsin Card Sorting Test. By means of a factorial analysis, a composite measure of EF was extracted. Performance according to genotypic group was analyzed, including age as a confounder. In addition, a family-based association test was conducted as a confirmatory analysis. Principal components analysis of neuropsychological measures loaded two factors that explained 83.8% of total variance. Cognitive performance, as measured by the composite score, showed significant difference between genotypic groups after adjustment for age ($p=0.002$). The CC homozygosity was associated with a diminished global EF performance, a result that was corroborated by the intra-familial analysis. The present study demonstrated an association between the neuropsychological performance of children with ADHD and a functional polymorphism in the promoter region of the DBH gene. The refinement of the ADHD phenotype by means of composite measures of EF can contribute to uncover the molecular underpinnings of ADHD.

Key words: attention-deficit/hyperactivity disorder; dopamine-beta-hydroxylase; endophenotype; executive functions

Introduction

Mounting evidence implicates catecholaminergic imbalance in the neurobiological basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) [Pliszka, 2005]. Dopamine- β -hydroxylase (DBH) catalyzes the conversion of dopamine (DA) into norepinephrine (NE) and is found in sympathetic terminals, adrenal glands, and in the prefrontal cortex (PFC). It is stored in catecholamine-containing vesicles and released along with DA and NE by exocytosis into the extracellular space [Cubells and Zabetian, 2004].

DBH activity and levels are under strong genetic control [Weinshilboum, 1978]. High concentrations of DBH have been identified in human PFC [Gaspar et al., 1989], and knockout mouse models have demonstrated that DBH levels and activity in the PFC are regulated by a gene-dosage effect [Bourdlat-Parks et al., 2005]. Serum and cerebrospinal fluid levels exhibit important inter-individual variation and stability in adult life [Jonsson et al., 2004]. In the pediatric population, a marked increase is observed during childhood, with a decrease and stabilization occurring in adolescence [Freedman et al., 1972; Paclt and Kouddelova, 2004].

The chromosomal localization for DBH, the gene encoding DBH, is at 9q34 [Craig et al., 1988]. A restriction site in intron 5 (Taq1) was the first DBH polymorphism associated with ADHD [Daly et al., 1999]. Although results have been dissonant, indicating a possible linkage disequilibrium with the true variant [Tang et al., 2006], a combined odds ratio of 1.33 (95% CI 1.11-1.59) was obtained after pooling together all published family-based studies [Faraone et al., 2005]. More recently, this same polymorphism has been associated with performance in sustained and temporal attention tasks among children and adolescents with ADHD [Bellgrove et al.,

2006a,b]. In a longitudinal study, the Taq1 polymorphism was linked to hyperactivity during childhood, poorer test scores in hyperactive adolescents, and earning less money on a card playing task in adults [Barkley et al., 2006]. In healthy adults, another DBH polymorphism (G444A) has also been implicated in cognitive performance, with results suggesting a selective association with working memory but not with visuospatial attention [Parasuraman et al., 2005].

The major genetic marker for DBH activity, nonetheless, seems to be located at DBH promoter region and was identified by Zabetian et al. [2001]. They demonstrated that the -1021 C/T polymorphism (rs1611115) was responsible for up to 50% of the variation of plasma DBH activity in three ethnically distinct populations. To date, few studies have investigated the association between this functional polymorphism and ADHD. Results have been inconclusive, including one report of lack of association [Bhaduri and Mukhopadhyay, 2006] and two other studies exhibiting puzzling associations that conferred risk according to subtype, gender, and presence of disruptive behavior [Zhang et al., 2004 and 2005]. Taken together, the literature suggests that the role of DBH polymorphisms on the pathophysiology of ADHD warrants further investigation [Wigg et al., 2002].

The clinical and biological heterogeneity of ADHD requires investigational strategies to address its complexity at both levels. Rather than dichotomic symptom-based categorization (i.e., either present or absent), ADHD should be regarded as a phenomenological continuum. Additionally, it is likely that different subgroups of ADHD patients present distinct characteristics, making the search for a single core deficit unpromising [Nigg et al., 2005; Pennington, 2005]. The use of the endophenotypic approach in the study of the molecular bases of ADHD may enhance

the sensitivity to specific dimensions of the disorder [Sergeant, 2005a; Waldman, 2005].

A meta-analysis by Willcutt et al. [2005] suggested that executive functions (EF) are suitable as endophenotypic measures for ADHD. The joint analysis of more than six thousand individuals with and without ADHD revealed that despite the significant impairment of ADHD subjects in all tasks, executive dysfunctions were not universally present in the ADHD group. In this sense, the identification of a particular subset of ADHD patients presenting with selective neuropsychological impairments propels the search for specific neurobiological substrates [Waldman et al., 2006]. Interestingly, evidence from familial aggregation and real-world impairments supports this idea. Nigg et al. [2004] identified the presence of neuropsychological deficits in relatives of a subgroup of ADHD children with EF deficits. Biederman et al. [2004] showed that among children with ADHD, those with executive dysfunction were at higher risk for grade retention and decreased academic achievement in comparison to those with ADHD alone. In another work, Biederman et al. [2006] demonstrated additional support for the external validity of an EF subgroup in a sample of persistent ADHD: those with psychometrically defined deficits had an increased risk for academic and occupational underachievement.

In order to parse individuals with and without executive dysfunction, studies usually employ arbitrary cut-off points (e.g., 90th percentile or 1.5 standard deviations). However, like ADHD characteristics, results from EF tasks are not discrete entities, but instead are a quantitatively distributed continuum [Sonuga-Barke, 2005]. An alternative in managing multiple neuropsychological measures is to develop composite scores that capture the cognitive dimensions of ADHD. Combined variables may be devised according to theoretical assumptions and/or statistical criteria (e.g.,

by means of factorial analyses) [Doyle et al. 2005]. This would provide the ability to aggregate information into a reduced number of constructs that are psychometrically robust (reduced measure-associated error) and conceptually powerful.

The aim of this work was to appraise the association and linkage between the -1021 DBH polymorphism and EF performance among patients presenting with ADHD.

Despite previous reports of association between the intronic Taq1 polymorphism and ADHD (including a family-based study conducted by our group [Roman et al., 2002]), the -1021C/T polymorphism was chosen in this work because of its known functional role in the regulation of an enzyme critical to catecholaminergic systems. The hypothesis to be tested was that the refinement of the ADHD phenotype by means of composite measures of EF would allow the detection of the role of different DBH genetic backgrounds on the neuropsychological performance of children and adolescents with ADHD.

Materials and methods

Participants

The sample consisted of children and adolescents referred to the ADHD outpatient clinic at our University Hospital (HCPA). Inclusion criteria were age between 7 and 17 years; ADHD diagnosis according to DSM-IV [American Psychiatric Association, 2000]; drug naïve patients; and $IQ \geq 70$. Exclusion criterion was the presence of clinical conditions that could potentially interfere with the tests, e.g., blindness, deafness, pervasive developmental disorder, and other major neurological disorders. Parents provided written informed consent, and children or adolescents gave verbal assent to participate. This investigation was approved by the ethics committee of the HCPA.

Diagnostic procedures

Diagnostic procedures for ADHD and comorbid diagnoses in our unit have been previously described [Rohde, 2002] and comprise a three-stage process: (1) evaluation with a semi-structured interview (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children, Epidemiological Version - K-SADS-E) [Orvaschel, 1985], modified to assess DSM-IV criteria and applied to parents by trained research assistants - whose inter-rater reliability had been previously evaluated (kappas ranging from 0.77 to 1, $p < 0.001$); (2) discussion of each diagnosis derived through the K-SADS-E in a clinical committee chaired by a senior psychiatrist (LAR); and (3) clinical evaluation of ADHD and comorbid conditions using DSM-IV criteria by a child psychiatrist who had previously received the K-SADS-E results. When a diagnostic disagreement occurred in the three-stage process, priority was given for diagnoses obtained through clinical interviews. Severity of ADHD symptoms was assessed with the Swanson, Nolan, and Pelham (SNAP-IV) rating scale [Swanson et al., 2001].

Neuropsychological assessment

EF was measured by performance in the Wisconsin Card Sorting Test (WCST) [Berg, 1948] and in a version of the Continuous Performance Test (CPT) [Cornblatt et al., 1988]. Testing was administered by three trained psychologists using standardized procedures, including same software and hardware. Full Scale IQ was estimated from vocabulary and block design subtests of the Wechsler Intelligence Scale for Children - Third Edition [Wechsler, 1991]. Subjects performed a simplified version of the CPT [Conners, 1985], in which a series of numbers, from one to nine, appeared randomly,

one at a time, with a two seconds interval, for nine minutes, on the computer screen. Individuals were required to press a button whenever the number six appeared. Omission (missed targets) and commission (incorrect targets) errors were computed and adjusted respectively for the number of times the selected and other digits appeared. In the 128-cards computerized version of the WCST, each patient was required to match series of cards according to varying criteria (number, color, or shape). Subjects were not instructed about how cards should be matched, having to apprehend the criterion from feedback given after each choice (correct or incorrect). Generated scores are number of total errors, perseverative and nonperseverative errors, perseverative responses and achieved categories.

Genotyping

For each subject, high molecular weight genomic DNA was extracted from whole blood by a standard salting out procedure. Polymerase chain reaction (PCR) amplification and genotyping of the DBH promoter region were performed as previously described by Köhnke et al. [2002].

Statistical analyses

Association between genotype and neuropsychological performance was assessed using analysis of covariance (ANCOVA). In order to obtain a normal distribution, CPT and WCST scores were ranked before inclusion in factorial and covariance analyses [Montgomery, 1997].

Potential confounders - covariates - evaluated were age, sex, ethnic background, ADHD subtype, severity of symptoms (SNAP-IV scores), IQ, and comorbidity (mood,

anxiety, and disruptive behavior disorders). A confounder was defined as a variable associated with both independent and dependent variables ($p \leq 0.2$) [Maldonado and Greenland, 1993]. Comparison among categorical variables was performed using χ^2 or Fisher's exact test; continuous variables were compared by Student T test or Mann-Whitney U test, according to data distribution.

Principal components analysis was used to identify factors of cognitive performance and to quantify the amount of variability accounted by each generated factor. This procedure also provided factorial scores - composite variables representative of underlying dimensions. Criteria adopted for factor loading included eigenvalues greater than 1, scree plot analysis, Kaiser-Meyer-Olkin measure of sampling adequacy, and Bartlett's test of sphericity [Hair, 1998]. Extracted factors were rotated with the varimax orthogonal method, a strategy that minimizes the number of variables with high loadings on each factor. Factorial scores were obtained according to extracted factorial weighting and original variables values, generating new standardized scores (with a mean of 0 and a standard deviation equal to the squared multiple correlation between the estimated factor scores and the true factor values) that are suitable for subsequent analyses. All derived factorial scores were merged by simple sum in order to yield a composite measure of impairment.

This primary outcome variable was additionally analyzed in a family-based association test (FBAT) [Laird and Lange, 2006], a method that is robust against artifacts of population stratification and admixture. The FBAT is a generalization of the transmission disequilibrium test and it is used to assess simultaneously allele transmission and offspring trait values. The recently developed PBAT software [Lange, 2004] provides a test for the null hypothesis of both no linkage and no association via FBAT statistic, allowing also the use of continuously distributed traits

and the adjustment of potential confounders.

SPSS version 13.0 was used in all analyses except genotype distribution and FBAT statistic. The accepted level of significance was 0.05 for all analyses, excluding confounder assessment (conservative threshold of 0.2). All tests were two-tailed.

Results

Sample

Sixty-four children and adolescents were included in this study. Global mean age was 10.61 (SD±2.80) years, and mean IQ was 95.66 (SD±12.27). Boys constituted 81.25% of the entire group, for which the majority of subjects was from European ancestry (96.61%). Combined ADHD was the most frequent subtype (65.62%), and the most prevalent comorbidities were oppositional defiant disorder (45.31%), anxiety disorders (26.98%), and conduct disorder (18.75%). Characteristics according to genotype are shown in Table 1. Results indicated that only age survived our statistical threshold for a confounder variable, since it was associated with both the factor in study and the outcome for a $p \leq 0.2$. Thus, age was included as a confounder in all subsequent analyses. No other variable met criteria for a potential confounder.

Children and adolescents presented allelic frequencies of 73.4% for the C allele and 26.6% for the T allele; genotypic distribution in this sample was 54.7% for CC, 37.5% for CT and 7.8% for TT. CT and TT genotypes were pooled into a single group due to the low prevalence of the later. Frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p=0.599$). To perform the confirmatory family-based analysis, information on 49

trios was available - for the remaining 15 singletons there was no genotypic information from parents.

Neuropsychological performance

Principal components analysis of neuropsychological measures loaded two factors that explained 83.8% of total variance. As expected, scores obtained within the same neuropsychological test (i.e., WCST or CPT) were strongly correlated. With exception of WCST nonperseverative errors, which was excluded from subsequent analyses, all factor extractions exceeded the 0.3 loading level (Table 2). A global measure of cognitive impairment was obtained by the simple arithmetic sum of the two derived factorial scores. This combined score had normal distribution, with a mean of 0 and a standard deviation of 1.41.

Cognitive performance, as measured by the composite score, showed significant difference between genotypic groups after correcting for age ($p=0.002$). Estimated adjusted means indicated a worse performance of the CC group (composite score 0.390; 95% CI 0.043 to 0.737) when compared to the CT/TT group (global score -0.471; 95% CI -0.853 to -0.089). Inclusion of IQ or SNAP scores as covariates, albeit not required according to the adopted statistical criteria, was performed and did not significantly affected results (data not shown).

When factorial scores were assessed independently, the CPT score confirmed a significant association with genotype ($p=0.028$), whereas the WCST showed only a trend for association ($p=0.071$). In order to further investigate which elements were specifically associated to the DBH genotype, analyses of covariance were repeated for every single neuropsychological measurement. Individual items in both CPT and

WCST correlated with genotypic group after adjustment for age. Patients with the CC genotype made more errors of both commission and omission and also presented a perseverative prone response style (Table 3).

Because not all families had heterozygous parents, only 32 out of the 49 available trios were informative for the confirmatory analysis. Results obtained in the association test were corroborated by the FBAT analyses, as the DBH -1021 C/T polymorphism transmission showed association and linkage with neuropsychological performance even after adjustment for age ($p=0.041$). Again, in this subsample, subjects with CC homozygosity had a worse cognitive performance in comparison to those with CT or TT genotypes.

Discussion

This work investigated the impact of a DBH polymorphism on the neuropsychological achievement of children and adolescents with ADHD in tests of EF. By means of a factorial analysis, a composite index of cognitive impairment was devised in order to capture latent dimensions of CPT and WCST. The CC homozygosity at the -1021 position of the DBH gene was associated with a diminished global EF performance, as well as with worse individual scores in both the CPT and the WCST.

Published data suggest that DBH genotypic status has a significant impact in cognitive function among individuals with [Barkley et al., 2006; Bellgrove et al., 2006a,b] and without [Parasuraman et al., 2005; Togsverd et al., in press] ADHD. Comparison among studies remains limited since research that investigated the role of DBH polymorphisms on cognitive performance analyzed different polymorphisms. Tang et al. [2006] investigated the contribution of both -1021C/T and Taq1 variations to the

plasma DBH levels. They found that although Taq1 was significantly associated with enzymatic levels, this association was largely explained by linkage disequilibrium with the -1021C/T polymorphism: in a model that included these two and a third polymorphism, Taq1 accounted for only 4% of the DBH plasma variance. The same study also showed that the lack of biunivocity between alleles hinders a precise correspondence between loci.

While cellular and imaging studies have shown that optimal levels of DA and NE are needed for proper activation of the PFC [Arnsten and Li, 2005], recent neurocomputational models are disentangling the roles of DA and NE in cognitive deficits of ADHD. Computational approaches advocate that DA serves as a gating system, having a critical role in reinforcement learning [Montague et al., 2004] and in working memory updating performance [Frank et al., in press]. NE dysregulation seems to be related to an inconsistent response style, including deficits such as erratic switching behavior and increased response variability due to a decreased signal-to-noise ratio. Catecholaminergic modulation would follow the principles of a Yerkes-Dodson curve (inverted-u relationship between arousal and performance), according to which insufficient or excessive neurotransmitter levels would result in suboptimal performance [Aston-Jones and Cohen, 2005].

Animal studies may help to identify the nature of the neurochemical imbalances underlying ADHD phenomenology. Spontaneous hypertensive rats (SHR) are among the most investigated animal models of ADHD, presenting poor stability of performance and impaired ability to withhold responses [Sagvolden et al., 2005]. Different studies evidenced decreased DA release and deficient inhibitory control over NE terminals, revealing a hypodopaminergic and hypernorepinephric profile for the SHR [Russel, 2002]. Mice knockout for the *Dbh* gene presented more differences

in DA than in NE levels, highlighting the importance of the DA/NE ratio [Oades et al., 2005]: although absent in the PFC of -/- mice, NE was only slightly decreased in +/- animals, whereas DA levels were increased five and twofold respectively [Bourdelat-Parks et al., 2005]. This is in accordance with the model proposed by Cubells and Zabetian [2004], in which lower levels of DBH protein may lead to elevated ratios of DA to NE. They postulate that DBH can act as the rate-limiting enzyme for the conversion of DA to NE and that this effect would be more pronounced in areas having DA receptors and receiving NE innervation, such as the PFC [Devoto et al., 2001].

Only patients who had never made use of any neurological or psychiatric medication took part in this study (this procedure was possible since neuropsychological evaluation is part of the diagnostic battery in our clinic). The sample included patients with different patterns of comorbidities and a relatively large age span. Notwithstanding the goal of phenotype refinement, these features increase external validity of our findings and were allowed by the adoption of a conservative analysis of potential confounders. An important limitation of the present study was the small sample size (n=64). Nevertheless, analyses exhibited sufficient power to detect significant differences in the main composite outcome. It should be underscored that further replications in larger samples are necessary to confirm these results.

Another caveat of the present work refers to the reduced set of neuropsychological outcomes evaluated. Recently developed tests are increasingly sophisticating the depiction of ADHD endophenotypes, emphasizing domains other than EF [Nigg, 2005; Sergeant, 2005b]. Nonetheless, the tests here employed have well-established psychometric properties in the literature and are widely used in the clinical setting. In addition, these measures have been shown to be correlated with impairments in

real-world activities: deficits in set-shifting, e.g. WCST perseverative errors and responses, were demonstrated to be associated with problems in goal-directed behavior in route task both in videogames and in the zoo [Lawrence et al., 2004].

Dimensional analyses based on factorial scores are a reliable alternative to the use of raw scores, despite the disadvantage of being less readily interpretable [Koren et al., 1998]. The validity of the findings here reported is supported by the convergent results obtained with the two independent analytical methods employed, reassured by the conservative analyses of potential confounders. The use of family-based association tests provides an analysis that is resilient to population stratification, one of the most critical limitations of contemporary candidate gene studies. Since developmental fluctuations in DBH levels have been documented, the inclusion of age as a confounder may also have potentially corrected for enzymatic activity differences across ages.

Further investigation of the dynamics of gene-gene and gene-environment interactions is of capital importance for understanding the exact role of DBH polymorphisms on cognitive function of patients with ADHD. Longitudinal studies and examination of other putative endophenotypes are among the most promising strategies. The present study demonstrated an association between neuropsychological performance and a functional polymorphism in the promoter region of the DBH gene. One straightforward explanation is that the CC homozygosity reflects an increased expression of the DBH enzyme due to its effect in gene transcription control, thus converting more DA into NE. Alterations in enzymatic activity may cause catecholaminergic imbalance in the PFC, probably as a result from decreased inhibitory DA activity associated with an increased NE activity. This might be relevant given the fact that maximal PFC performance relies on moderate

stimulation of receptors, and may be limited by extreme levels of neurotransmitters. Future research will refine the current understanding of how genetic and environmental factors affect attentional processes by regulating the neurochemical milieu.

Acknowledgments:

This work was partially supported by research grants from CNPq (Institutos do Milênio, 471761/03-6 and 300226/2002-0), Pronex-Fapergs, CAPES (scholarship to CK), and Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The authors wish to thank Heloisa Kaefer, Márcia Knijnik, and Natália Soncini for conducting neuropsychological testing.

References

- American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV. 1994. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV. Washington DC: American Psychiatric Association. 886 p.
- Arnsten AF, Li BM. 2005. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 57:1377-1384.
- Aston-Jones G, Cohen JD. 2005. An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci* 28:403-450.
- Barkley RA, Smith KM, Fischer M, Navia B. 2006. An examination of the behavioral and neuropsychological correlates of three ADHD candidate gene polymorphisms (DRD4 7+, DBH TaqI A2, and DAT1 40 bp VNTR) in hyperactive and normal children followed to adulthood. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141:487-498.
- Bellgrove MA, Hawi Z, Gill M, Robertson IH. 2006a. The cognitive genetics of

- attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): sustained attention as a candidate phenotype. *Cortex* 42:838-845.
- Bellgrove MA, Mattingley JB, Hawi Z, et al. 2006b. Impaired temporal resolution of visual attention and dopamine beta hydroxylase genotype in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 60:1039-1045.
- Berg EA. 1948. A simple objective technique for measuring flexibility in thinking. *Journal of General Psychology* 39:15-22.
- Bhaduri N, Mukhopadhyay K. 2006. Lack of significant association between -1021C->T polymorphism in the dopamine beta hydroxylase gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Lett* 402:12-16.
- Biederman J, Monuteaux MC, Doyle AE, et al. 2004. Impact of executive function deficits and attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) on academic outcomes in children. *J Consult Clin Psychol* 72:757-766.
- Biederman J, Petty C, Fried R, et al. 2006. Impact of psychometrically defined deficits of executive functioning in adults with attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 163:1730-1738.
- Bourdelat-Parks BN, Anderson GM, Donaldson ZR, et al. 2005. Effects of dopamine beta-hydroxylase genotype and disulfiram inhibition on catecholamine homeostasis in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 183:72-80.
- Conners CK. 1985. The Computerized Continuous Performance-Test. *Psychopharmacology Bulletin* 21:891-892.
- Cornblatt BA, Risch NJ, Faris G, Friedman D, Erlenmeyerkimling L. 1988. The Continuous Performance-Test, Identical Pairs Version (CPT-IP). 1. New findings about sustained attention in normal-families. *Psychiatry Research* 26:223-238.
- Craig SP, Buckle VJ, Lamouroux A, Mallet J, Craig IW. 1988. Localization of the human dopamine beta hydroxylase (DBH) gene to chromosome 9q34.

- Cytogenet Cell Genet 48:48-50.
- Cubells JF, Zabetian CP. 2004. Human genetics of plasma dopamine beta-hydroxylase activity: applications to research in psychiatry and neurology. *Psychopharmacology (Berl)* 174:463-476.
- Daly G, Hawi Z, Fitzgerald M, Gill M. 1999. Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. *Mol Psychiatry* 4:192-196.
- Devoto P, Flore G, Pani L, Gessa GL. 2001. Evidence for co-release of noradrenaline and dopamine from noradrenergic neurons in the cerebral cortex. *Mol Psychiatry* 6:657-664.
- Doyle AE, Willcutt EG, Seidman LJ, et al. 2005. Attention-deficit/hyperactivity disorder endophenotypes. *Biol Psychiatry* 57:1324-1335.
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, et al. 2005. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1313-1323.
- Frank MJ, Santamaria A, O'Reilly R C, Willcutt E. in press. Testing Computational Models of Dopamine and Noradrenaline Dysfunction in Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *Neuropsychopharmacology*.
- Freedman LS, Ohuchi T, Goldstein M, Axelrod F, Fish I, Dancis J. 1972. Changes in human serum dopamine-beta-hydroxylase activity with age. *Nature* 236:310-311.
- Gaspar P, Berger B, Febvret A, Vigny A, Henry JP. 1989. Catecholamine innervation of the human cerebral cortex as revealed by comparative immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase and dopamine-beta-hydroxylase. *J Comp Neurol* 279:249-271.
- Hair JF, Tatham RL, Anderson RE, Black W. 1998. *Multivariate data analysis*. Upper Saddle River: Prentice Hall. 768 p.
- Jonsson EG, Bah J, Melke J, et al. 2004. Monoamine related functional gene variants

- and relationships to monoamine metabolite concentrations in CSF of healthy volunteers. *BMC Psychiatry* 4:4.
- Köhnke MD, Zabetian CP, Anderson GM, Kolb W, Gaertner I, Buchkremer G, Vonthein. 2002. A genotype-controlled analysis of plasma dopamine beta-hydroxylase in healthy and alcoholic subjects: evidence for alcohol-related differences in noradrenergic function. *Biol Psychiatry* 52:1151-1158.
- Koren D, Seidman LJ, Harrison RH, et al. 1998. Factor structure of the Wisconsin Card Sorting Test: dimensions of deficit in schizophrenia. *Neuropsychology* 12:289-302.
- Laird NM, Lange C. 2006. Family-based designs in the age of large-scale gene-association studies. *Nature Reviews Genetics* 7:385-394.
- Lange C, DeMeo D, Silverman EK, Weiss ST, Laird NM. 2004. PBAT: tools for family-based association studies. *Am J Hum Genet* 74:367-369.
- Lawrence V, Houghton S, Douglas G, Durkin K, Whiting K, Tannock R. 2004. Executive function and ADHD: a comparison of children's performance during neuropsychological testing and real-world activities. *J Atten Disord* 7:137-149.
- Maldonado G, Greenland S. 1993. Simulation study of confounder-selection strategies. *Am J Epidemiol* 138:923-936.
- Montague PR, Hyman SE, Cohen JD. 2004. Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature* 431:760-767.
- Montgomery DC. 1997. *Design and analysis of experiments*. New York: Wiley. 720 p.
- Nigg JT. 2005. Neuropsychologic theory and findings in attention-deficit/hyperactivity disorder: the state of the field and salient challenges for the coming decade. *Biol Psychiatry* 57:1424-1435.
- Nigg JT, Blaskey LG, Stawicki JA, Sachek J. 2004. Evaluating the endophenotype model of ADHD neuropsychological deficit: results for parents and siblings of children with ADHD combined and inattentive subtypes. *J Abnorm Psychol*

113:614-625.

- Nigg JT, Willcutt EG, Doyle AE, Sonuga-Barke EJ. 2005. Causal heterogeneity in attention-deficit/hyperactivity disorder: do we need neuropsychologically impaired subtypes? *Biol Psychiatry* 57:1224-1230.
- Oades RD, Sadile AG, Sagvolden T, et al. 2005. The control of responsiveness in ADHD by catecholamines: evidence for dopaminergic, noradrenergic and interactive roles. *Developmental Science* 8:122-131.
- Orvaschel H. 1985. Psychiatric Interviews Suitable for Use in Research with Children and Adolescents. *Psychopharmacology Bulletin* 21:737-745.
- Paclt I, Koudelova J. 2004. Changes of dopamine-beta-hydroxylase activity during ontogenesis in healthy subjects and in an experimental model (rats). *Physiol Res* 53:661-667.
- Parasuraman R, Greenwood PM, Kumar R, Fossella J. 2005. Beyond heritability - Neurotransmitter genes differentially modulate visuospatial attention and working memory. *Psychological Science* 16:200-207.
- Pennington BF. 2005. Toward a new neuropsychological model of attention-deficit/hyperactivity disorder: subtypes and multiple deficits. *Biol Psychiatry* 57:1221-1223.
- Pliszka SR. 2005. The neuropsychopharmacology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1385-1390.
- Rohde LA. 2002. ADHD in Brazil: the DSM-IV criteria in a culturally different population. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41:1131-1133.
- Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. 2002. Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-beta-hydroxylase gene. *Am J Med Genet* 114:154-158.
- Russell VA. 2002. Hypodopaminergic and hypernoradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder--

- the spontaneously hypertensive rat. *Behav Brain Res* 130:191-196.
- Sagvolden T, Russell VA, Aase H, Johansen EB, Farshbaf M. 2005. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1239-1247.
- Sergeant J. 2005a. Are we ready for endophenotypes in attention deficit hyperactivity disorder? *Rev Bras Psiquiatr* 27:262-263.
- Sergeant J. 2005b. Modeling attention-deficit/hyperactivity disorder: a critical appraisal of the cognitive-energetic model. *Biol Psychiatry* 57:1248-1255.
- Sonuga-Barke EJ. 2005. Causal models of attention-deficit/hyperactivity disorder: from common simple deficits to multiple developmental pathways. *Biol Psychiatry* 57:1231-1238.
- Swanson JM, Kraemer HC, Hinshaw SP, et al. 2001. Clinical relevance of the primary findings of the MTA: success rates based on severity of ADHD and ODD symptoms at the end of treatment. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40:168-179.
- Tang YL, Buxbaum SG, Waldman I, et al. 2006. A single nucleotide polymorphism at DBH, possibly associated with attention-deficit/hyperactivity disorder, associates with lower plasma dopamine beta-hydroxylase activity and is in linkage disequilibrium with two putative functional single nucleotide polymorphisms. *Biological Psychiatry* 60:1034-1038.
- Togsverd M, Werge TM, Tanko LB, et al. in press. Cognitive performance in elderly women: significance of the 19bp insertion/deletion polymorphism in the 5' flank of the dopamine beta-hydroxylase gene, educational level, body fat measures, serum triglyceride, alcohol consumption and age. *Int J Geriatr Psychiatry*.
- Waldman ID. 2005. Statistical approaches to complex phenotypes: evaluating neuropsychological endophenotypes for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1347-1356.

- Waldman ID, Nigg JT, Gizer IR, Park L, Rappley MD, Friderici K. 2006. The adrenergic receptor alpha-2A gene (ADRA2A) and neuropsychological executive functions as putative endophenotypes for childhood ADHD. *Cognitive Affective & Behavioral Neuroscience* 6:18-30.
- Wechsler D, Psychological Corporation. 1991. WISC-III: Wechsler Intelligence Scale for Children: manual. San Antonio: Psychological Corp.
- Weinshilboum RM. 1978. Serum dopamine beta-hydroxylase. *Pharmacol Rev* 30:133-166.
- Wigg K, Zai G, Schachar R, et al. 2002. Attention deficit hyperactivity disorder and the gene for dopamine-beta-hydroxylase. *Am J Psychiatry* 159:1046-1048.
- Willcutt EG, Doyle AE, Nigg JT, Faraone SV, Pennington BF. 2005. Validity of the executive function theory of attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Biol Psychiatry* 57:1336-1346.
- Zabetian CP, Anderson GM, Buxbaum SG, et al. 2001. A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine beta-hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am J Hum Genet* 68:515-522.
- Zhang HB, Wang YF, Li J, Wang B, Yang L. 2004. [Association of dopamine beta-hydroxylase polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder in children]. *Beijing Da Xue Xue Bao* 36:290-293.
- Zhang HB, Wang YF, Li J, Wang B, Yang L. 2005. [Association between dopamine beta hydroxylase gene and attention deficit hyperactivity disorder complicated with disruptive behavior disorder]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 43:26-30.

Table 1. Sample characteristics according to DBH genotype and analyses of potential confounders

	CC n=35	CT/TT n=29	group difference (p-value)
Age - mean (sd)	11.1 (3.1)	10.1 (2.3)	.15*
IQ - mean (sd)	93.7 (11.7)	97.0 (12.8)	.17
Males - n (%)	26 (74.3)	26 (89.7)	.20
European ancestry - n (%)	31 (93.9)	29 (100.0)	.49
ADHD combined - n (%)	25 (71.4)	17 (58.6)	.28*
Total SNAP - mean (sd)	1.7 (0.7)	1.6 (0.5)	.48
Mood - n (%)	4 (11.4)	4 (13.8)	.1
Anxiety - n (%)	7 (20.0)	10 (34.5)	.25
ODD - n (%)	19 (54.3)	10 (34.5)	.11
CD - n (%)	7 (20.0)	5 (17.2)	.78

*=Associated with neuropsychological performance for a $p \leq 0.2$; DBH, dopamine-beta-hydroxylase; ADHD, Attention-deficit/hyperactivity Disorder; SNAP, Swanson, Nolan, and Pelham rating scale; ODD, Oppositional defiant disorder; CD, Conduct disorder.

Table 2. Principal components analysis of neuropsychological measures: rotated matrix loadings and communalities

	components		communalities
	1	2	
WCST total errors	0.901	0.168	0.839
WCST perseverative responses	0.911	0.176	0.860
WCST perseverative errors	0.926	0.180	0.891
WCST achieved categories	-0.767	-0.188	0.624
CPT errors of omission	0.166	0.938	0.908
CPT errors of commission	0.216	0.927	0.906

WCST, Wisconsin Card Sorting Test; CPT, Continuous Performance Test.

Table 3. Neuropsychological performance according to DBH genotype

test	CC n=35		CT/TT n=29		analyses*	
	median	range	median	range	F	p
CPT						
omission errors	0.146	0.911	0.129	0.875	4.836	0.032
commission errors	0.012	0.165	0.010	0.065	9.237	0.003
WCST						
total errors	55	83	43	65	3.760	0.057
perseverative errors	23	87	19	75	5.270	0.025
nonperseverative errors	22	68	22	68	0.094	0.760
perseverative responses	25	119	20	98	4.744	0.033
achieved categories	4	12	4	13	1.905	0.173

*Adjusted for age; WCST, Wisconsin Card Sorting Test; CPT, Continuous Performance Test; DBH, dopamine-beta-hydroxylase.

7. Conclusão

Em uma amostra clínica de crianças e adolescentes com TDAH, identificou-se diferenças no desempenho neuropsicológico de acordo com grupo genotípico. A presença de pelo menos um alelo de 7 repetições do DRD4 esteve associada a um maior número de erros por comissão no CPT ($p=0,036$), enquanto que a homozigose 44 protegeu contra erros tanto por omissão ($p=0,017$) quanto por comissão ($p=0,025$), mesmo após ajuste para idade. Já em relação ao gene DBH, a homozigose CC no polimorfismo -1021 C/T esteve associada a um menor desempenho cognitivo, medido por um escore fatorial que explicou 83,8% do desempenho nos testes CPT e WCST ($p=0,002$).

A investigação de diferentes potenciais confundidores pode ser vista como um dos pontos fortes deste trabalho. A utilização de métodos como análise de componentes principais e análise familiar de desfechos contínuos também têm aparecido como estratégias promissoras para a obtenção de resultados mais robustos em estudos de herança complexa. Um dos principais desafios na pesquisa em endofenótipos neuropsicológicos do TDAH é a validação de critérios para a definição de um endofenótipo clinicamente relevante. Também será necessário o desenvolvimento de consensos sobre quais os testes neuropsicológicos mais apropriados para a investigação em TDAH, objetivando, *a posteriori*, uma padronização dos mesmos, de modo a permitir a replicação de estudos em diferentes populações. Não menos importante, o emprego do conceito de exofenótipos (marcadores externos ao fenótipo propriamente dito, e.g., perfil de comorbidades) também parece ser de extrema relevância para pesquisas futuras.

Os resultados aqui apresentados devem ser interpretados no contexto de algumas limitações. O desenho naturalístico deste trabalho, com todas as suas limitações metodológicas inerentes, o coloca no campo da pesquisa exploratória. O reduzido número de desfechos neuropsicológicos examinados, bem como a não inclusão de testes de domínios outros que funções executivas, também pode ser mencionada como uma restrição importante. O desenho aqui empregado também gerou limitações em termos de número de pacientes e familiares com genotipagem disponível. Trabalhos futuros serão necessários para a confirmação dos achados aqui relatados.

A repercussão biológica das alterações genéticas aqui investigadas ainda são incertas, mas, baseando-se em trabalhos prévios, são possíveis algumas especulações. Estudos *in vitro* sugerem que alelos do DRD4 que não o de 4 repetições apresentam uma resposta diminuída ao estímulo catecolaminérgico na redução dos níveis intracelulares de AMP cíclico, fenômeno que poderia estar associado a uma neurotransmissão menos eficaz. Em relação ao gene DBH, sabe-se que a expressão da enzima DBH é fortemente regulada pelo polimorfismo -1021, estando a presença de ao menos uma cópia do alelo T associada a níveis enzimáticos reduzidos se comparados aos encontrados na homozigose CC. Tais diferenças, ao acarretar prováveis alterações na regulação dos neurotransmissores NA e DA em determinadas regiões cerebrais, se traduzem em perfis distintos de desempenho em testes neuropsicológicos entre pacientes com TDAH.

A redução da variabilidade fenomenológica por meio do uso de testes neuropsicológicos de função executiva permitiu a identificação de subgrupos de pacientes com TDAH associados a polimorfismos funcionais de genes que codificam proteínas do sistema catecolaminérgico. Além disso, observou-se que o refinamento

do fenótipo TDAH por meio de medidas compostas de funções executivas pode ajudar no entendimento das bases moleculares do transtorno. Tais achados fornecem evidência adicional acerca do papel de polimorfismos dos genes DRD4 e DBH no desempenho de crianças e adolescentes com o diagnóstico de TDAH em testes neuropsicológicos de funções executivas.